

Petroselinum crispum und Zingiber officinale in einer Trophoblastfunktion-in-vitro-Studie

Extrakte von Petersilien- und Ingwerwurzel in einer in-vitro-Studie

eingereicht am 30.10.2016

vorgelegt von

Jens Haumann, geb. am 23.08.1989 in Überlingen

Im Reisgarten 19

88690 Uhltingen-Mühlhofen

Universität Rostock

Forschungslabor der Universitätsfrauenklinik am Klinikum Süd

Prof. Dr. med. Volker Briese

Südring 81

18059 Rostock

urn:nbn:de:gbv:28-diss2017-0114-5

Verteidigt am 18.07.2017

Gutachter:

1. Prof. Dr. med Volker Briesse (Rostock, Forschungslabor der Frauenklinik)
2. Prof. Dr. med. habil. Karin Kraft (Rostock, Lehrstuhl für Naturheilkunde)
3. Prof. Dr. med. Rainer Böger (Hamburg, Institut für Pharmakologie und Toxikologie)

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	5
1.1	Ziel der Arbeit.....	5
1.2	Überblick	5
1.3	Folsäure	5
1.4	Plazenta	7
1.4.1	Aufbau des Zottensystems und der Plazentaschranke	8
1.4.2	Entwicklung der Plazenta	10
1.4.3	Trophoblastzellsystem.....	10
1.4.4	Humanes Choriongonadotropin.....	11
1.4.5	Estrogene.....	12
1.5	Petroselinum crispum var. Tuberosum	13
1.5.1	Wirkstoffe und Wirkungen	14
1.5.2	Ist Petroselinum crispum ein Abortivum?	15
1.6	Vergleichssubstanz Zingiber officinale	17
2	Material und Methoden	19
2.1	Wurzelsaft- und Extraktherstellung nach Richter/Briese.....	19
2.1.1	Ingwerwurzelextrakt	19
2.1.2	Petersilienwurzelextrakt.....	19
2.1.3	Verdünnungsreihen	20
2.2	Herkunft der Placentae	20
2.3	Trophoblastzellisolierung	21
2.3.1	Prinzip sowie Auswahl des Verfahrens.....	21
2.3.2	Präparation	21
2.3.3	Verdauungsschritte	22
2.3.4	Erythrolyse.....	23
2.3.5	Percoll-Dichtegradientenzentrifugierung.....	23
2.3.6	MACS-Separierungsmethode	24
2.3.7	Zellzählung und Verdünnung des Isolats.....	25
2.4	Testverfahren und durchgeführte Versuche	26
2.4.1	Grundsätzliches Vorgehen, Kulturanlage und zeitliche Abfolge der Versuche	26
2.4.2	Statistische Analyse und Literaturverwaltung.....	26
2.4.3	Mineralien- und Glucosekonzentration der Extrakte.....	26

2.4.4	Pyrolyse-Feldionisations-Massenspektrometrie (Py-FIMS).....	27
2.4.5	Lichtmikroskopische Verlaufskontrolle	28
2.4.6	Gewinnen von zellfreiem Überstand.....	29
2.4.7	Glucosekonzentration	29
2.4.8	pH-Messung.....	29
2.4.9	MTT- Zellviabilität.....	30
2.4.10	LDH-Zytotoxizität.....	31
2.4.11	H ₂ O ₂ -Konzentration (Oxidativer Stress)	34
2.4.12	Hormonkonzentration.....	37
2.4.13	Immunhistochemie.....	38
3	Ergebnisse.....	41
3.1	Folsäure- Mineralien- und Glucosekonzentration der Extrakte.....	41
3.2	Pyrolyse-Feldionisations-Massenspektrometrie (Py-FIMS)	42
3.2.1	Petersilienwurzel	43
3.2.2	Ingwerwurzel	44
3.3	Trophoblastisolierung und Lichtmikroskopie	45
3.4	Immunhistochemie.....	48
3.5	Glucosekonzentration	49
3.6	pH-Messung.....	54
3.7	H ₂ O ₂ -Konzentration	56
3.8	LDH-Zytotoxizitäts-Test	60
3.9	MTT-Zellviabilitäts-Test	61
3.10	Hormonproduktion.....	63
3.10.1	β-hCG-Konzentration.....	63
3.10.2	17-β-Estradiol-Konzentration	65
4	Diskussion.....	68
4.1	Untersuchung der Extrakte	68
4.1.1	Folsäure-, Elektrolyt-, Glucose- und pH-Werte	68
4.1.2	Feldionisations-Massenspektrometrie (FIMS)	69
4.2	Zellkulturen- und Methodenkritik.....	70
4.2.1	Trophoblastkulturen.....	70
4.2.2	Methodenkritik.....	71
4.3	Beurteilung der Ingwerprobe	72
4.4	Beurteilung des Petersilienwurzelextrakts.....	74

4.4.1	Allgemeiner Zellmetabolismus und Lichtmikroskopie	74
4.4.2	Hormonsyntheseleistung	75
4.4.3	Oxidativer Stress.....	76
4.5	Fazit	78
5	Ausblick.....	79
6	Zusammenfassung.....	80
7	Thesen zur Promotionsschrift	82
8	Referenzen	83
9	Anhang.....	90
9.1	Verwendete Chemikalien, Puffer, Lösungen und Test-Kits.....	90
9.2	Zusammenarbeit mit Instituten und (Fremd-)Einrichtungen.....	92
9.3	Abbildungsverzeichnis	93
9.4	Tabellenverzeichnis	95
9.5	Formelverzeichnis.....	95
9.6	Abkürzungsverzeichnis	96
9.7	Lebenslauf	Fehler! Textmarke nicht definiert.
9.8	Danksagung	99
9.9	Eidesstattliche Versicherung	100

1 Einleitung

1.1 Ziel der Arbeit

Wird es schwangeren Frauen zukünftig möglich sein, ihren erhöhten Folsäurebedarf zumindest teilweise mit einem natürlichen Saft aus der Petersilienwurzel decken zu können? Die Wirkung, die ein Saftextrakt auf Trophoblastzellen hat, soll in der vorliegenden in-vitro-Studie untersucht und bewertet werden. Da sich in der wissenschaftlichen Literatur zu diesem Thema keine Verweise finden, wird zur Bewertung vergleichend ein weiterer Pflanzenextrakt untersucht: Ingwer, der in der Geburtshilfe seit langer Zeit als natürliches und potentes Antiemetikum zur Verfügung steht, bietet sich als Vergleichssubstanz an.

1.2 Überblick

Die massenspektrometrische Analyse beider Extrakte soll zunächst ein Ausblick über die enthaltenen Komponenten ermöglichen. Über die rudimentäre Extraktanalyse hinaus, zielen die zu dieser Arbeit durchgeführten in-vitro-Experimente vorrangig auf die Erfassung der phytopharmakologischen Wirkungen der Pflanzensaftextrakte an Trophoblastzellen. Zu diesem Zweck werden 10 Trophoblastzellsuspensionen isoliert. 5 Zellsuspensionen stammen aus vollendeten Schwangerschaften (Term), die 5 übrigen wurden aus induzierten Aborten der 10.-12. Woche p. c. isoliert. Der Nachweis der Trophoblastzellen erfolgt immunhistochemisch. Nach der Beimpfung der Zellkulturen mit den Wurzel-Extrakten werden Untersuchungen zur Erhebung möglicher Auswirkungen durchgeführt. Wegen der großen Anzahl an potentiell pharmakologisch wirksamen Wurzelextrakt-Komponenten, wird eine breitgefächerte Ausrichtung der Experimente angestrebt, um möglichst viele Teilaspekte des Zellmetabolismus zu erfassen:

Neben der lichtmikroskopischen Dokumentation wird dazu der allgemeine Zellmetabolismus (Glucoseaufnahme, pH-Wert, oxidative Last), Hormonsyntheseleistung (hCG- und Estradiol-Konzentration), sowie die Zellviabilität (MTT) und gegebenenfalls vorhandene Zytotoxizität (LDH) berücksichtigt. Abschließend erfolgt eine Bewertung anhand der gegenübergestellten Ingwer-Probe sowie ein Vergleich mit aktueller wissenschaftlicher Literatur.

1.3 Folsäure

Die Struktur des wasserlöslichen Vitamin B₉ (Folsäure, Folat, Vitamin B₁₁, Vitamin M) wurde Anfang der 40er Jahre des vergangenen Jahrhunderts aufgeklärt. „Folium“ lässt sich aus dem Lateinischen mit

„das Blatt“ übersetzten (1). Demzufolge sind hohe Folsäurekonzentrationen vor allem in dunkelgrünem Blattgemüse wie Bohnen, Avocados, Broccoli, Spinat sowie in der Wurzel der Petersilienpflanze aufzufinden. Zu beachten ist, dass die Bioverfügbarkeit des durch Nahrungsmittel aufgenommen Folats sehr inkonstant ist und im Mittel nur der Hälfte der absolut aufgenommenen Dosis entspricht (2).

Durch eine NADPH/H⁺-abhängige Reduktion der Folsäure entsteht die physiologisch wirksame Tetrahydrofolsäure (THF). Die biochemische Funktion dieses Coenzym liegt in der Übertragung von C1-Gruppen, wie Methyl-, Hydroxymethyl- und Formylresten (3). Dies wiederum ist essentiell im Pyrimidin- und Purinstoffwechsel, weshalb gerade Zellteilung und -wachstum besonders abhängig von THF sind. Ein Mangel an Folsäure äußert sich daher nicht nur in der Reduktion der Nucleinsäuresynthese, sondern wirkt sich auch

negativ auf den Aminosäure- und Lipidstoffwechsel aus. Als erste pathologische Auswirkung eines Folsäuremangels zeigt sich beim Menschen eine Blutbildveränderung (megaloblastäre Anämie), da die Zellen des roten Knochenmarks mit ihrer hohen Teilungsrate zuerst vom Substratmangel betroffen sind. Des Weiteren können Verdauungsstörungen und Veränderungen an Schleimhäuten hinweisend auf einen Folatmangel sein (4).

Obwohl nur circa 20 Prozent der deutschen Bevölkerung ausreichend mit Folsäure versorgt sind (5), existiert hierzulande keine gesetzliche Anordnung zur Anreicherung in Lebensmitteln, wie es beispielsweise in den USA gehandhabt wird. Nach einer Studie der Deutschen Gesellschaft für Ernährung (DGE) nahmen die Deutschen 2005 im

Durchschnitt nicht einmal zwei Drittel der empfohlenen Folsäuredosis zu sich (6) (vgl. Tabelle 1).

Gruppe	Folat
Alter	[µg-Äquivalent/Tag]
Säuglinge	
0 bis unter 4 Monate	60
4 bis unter 12 Monate	85
Kinder	
1 bis unter 4 Jahre	120
4 bis unter 7 Jahre	140
7 bis unter 10 Jahre	180
10 bis unter 13 Jahre	240
13 bis unter 15 Jahre	300
Jugendliche und Erwachsene	
15 bis unter 19 Jahre	300
19 bis unter 25 Jahre	300
25 bis unter 51 Jahre	300
51 bis unter 65 Jahre	300
65 Jahre und älter	300
Schwangere	550
Stillende	450

Tabelle 1: Folsäurebedarf nach DGE (6)

Der Vitamin B₉-Bedarf variiert mit dem Lebensalter. Ab dem 13. Lebensjahr empfiehlt die Institution indes grundsätzlich eine Einnahme von 300 µg Folatäquivalent pro Tag. Nur Schwangere und Stillende sind von der simpel anwendbaren Regel ausgenommen. In dieser besonderen Lebenssituation verdoppelt sich beinahe der Vitamin-Bedarf auf 550 µg (450 µg für Stillende) pro Tag (6). Bei Schwangeren erhöht eine Folatunterversorgung die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von geringem Geburtsgewicht, Frühgeburten, Aborten und Wachstumsverzögerungen. Zudem treten gehäuft Fehlbildungen beim Kind auf (6). Besonders in der frühen Embryonalentwicklung korreliert ein Folatmangel mit der Häufigkeit von Neuralrohrdefekten, wie Spina bifida und Anenzephalie, welche zu den Fehlbildungen des Gehirns und Rückenmarks zählen. Durch eine frühzeitige, bereits acht Wochen vor der Konzeption eingeleitete Supplementierung mit dem essentiellen Vitamin, lässt sich die Inzidenz der Neuralrohrdefekte (ca. 1,5 pro 1000 Schwangerschaften) um 30-75 % senken (7) (8) (9). Darüber hinaus scheint die Sprachentwicklung des Kindes gefördert zu werden (10), obgleich der biochemische Protektionsmechanismus in beiden Fällen noch nicht ausreichend geklärt ist (11).

1.4 Plazenta

Die Plazenta, auch „Mutterkuchen“ oder „Fruchtkuchen“ genannt, ist das primäre Stoffwechselorgan zwischen Mutter und Kind. Zusammen mit der Nabelschnur bildet die Plazenta ein Transportsystem, das Ernährung, Ausscheidung und Gasaustausch des Fötus sichert. Durch ihre Trennmembran gewährleistet das fetomaternale Organ den Substanz Austausch zwischen Fet und Mutter, ohne dass dabei das Blut der beiden Kreisläufe in direkten Kontakt zueinander kommt. Neben dieser Barrierefunktion ermöglicht erst die Hormonproduktion der Plazenta die Aufrechterhaltung der Schwangerschaft.

Nach der Geburt des Kindes werden Plazenta und Nabelschnur zusammen mit weiteren Eihäuten (Dottersack, Chorion, Amnion) als Nachgeburt ausgestoßen. Eine reife Plazenta aus der 38.-41. Schwangerschaftswoche wiegt zum Zeitpunkt der Geburt etwa ein Sechstel des Neugeborenen, was 500-600 g entspricht (12) (13). Der diskoidale Mutterkuchen weist eine Dicke von ca. 2,5 cm und einen Durchmesser von ungefähr 20 cm auf.

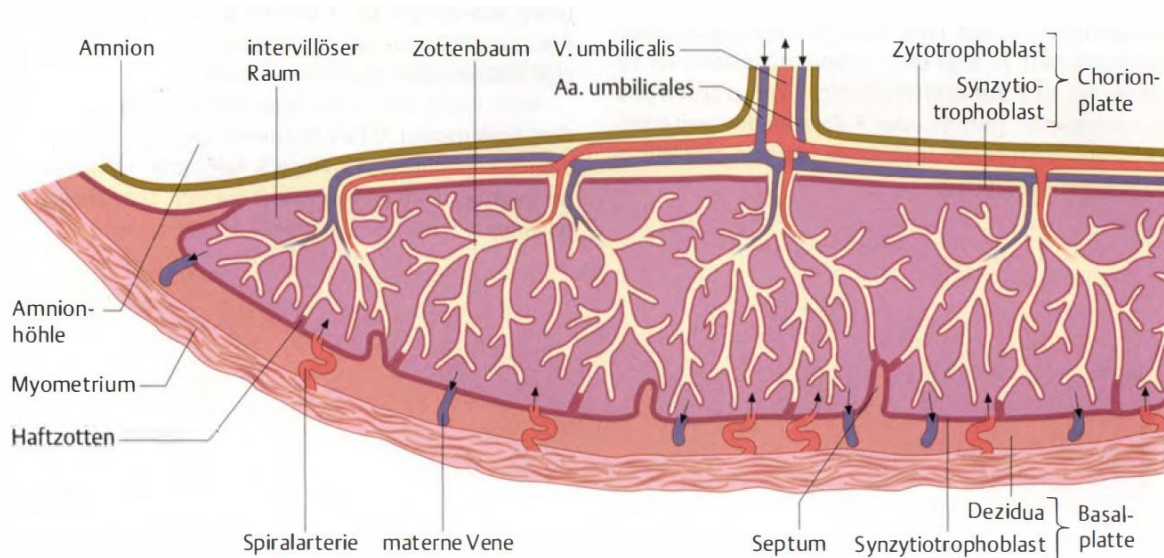


Abbildung 1: Schematische Darstellung eines Schnittbildes durch eine humane, reife Plazenta (14)

Die Abbildung 1 zeigt einen schematisierten Querschnitt durch eine Plazenta. Aus dieser Ansicht lässt sich die fetale Chorionplatte mit Zottenbäumen und Nabelschnur von den maternalen, dezidualen Anteilen der Basalplatte abgrenzen. Im Bindegewebe der Nabelschnur (Wharton-Sulze) verlaufen zwei Arterien und eine Vene in links torquierter Richtung. Als Verbindung zwischen Fetus und Plazenta tritt die Nabelschnur üblicherweise mittig in die mit Amnionepithel bekleidete Chorionplatte ein. Ab der Insertionsstelle teilen sich die Arteriae umbilicales auf und verlaufen radial durch das Choriongewebe, bis sie schließlich in den Zottenbäumen gabelförmige Versorgungsendäste im Zottenwerk bilden. Der Abtransport des fetalen, sauerstoffreichen Blutes über die Vena umbilicalis verläuft entsprechend gegenläufig - aus den Terminalzotten hin zum Fetus. Die Zottenbäume liegen im Intervillösen Raum, welcher sich zwischen der Basal- und Chorionplatte befindet. Von der Basalplatte aus umschließen deziduale Einbuchtungen bis zu vier Stammzotten, was eine räumliche wie auch funktionelle Aufteilung des Intervillösen-Raumes in Kotyledonen zu Folge hat. Maternales, sauerstoffreiches Blut gelangt durch endometriale Spiralarterien in den Intervillösen Raum, umströmt dort die fetalen Zottenbäume und drainiert schließlich über Endometrialvenen zurück.

1.4.1 Aufbau des Zottensystems und der Plazentaschranke

Zwischen Zottenwerk und Intervillösen Raum, wo sich die beiden Blutkreisläufe am nächsten kommen, findet der Substanz Austausch zwischen Mutter und Fet statt, welcher einzig durch die Plazentaschranke getrennt wird. Um diesen Austausch zu optimieren, teilt sich die Zotte baumförmig hin zu ihren spezialisierten Untereinheiten auf. Die in der Chorionplatte fest verankerte Stammzotte teilt sich astförmig in die Zwischenzotten, welche sich wiederum in viele dünne Terminalzotten verzweigen und weit in den intervillösen Raum ragen. Die Terminalzotten verfügen zur Oberflächenvergrößerung nicht nur über Mikrovilli, sondern auch über eine optimierte

Plazentaschranke. Diese Barriere setzt sich vom äußeren intervillösen Raum zum innen liegenden fetalen arterio-kapillär-venösen Netzwerk aus drei Schichten zusammen. Die äußere, dünne Ummantelung wird immer durch den mehrkernigen Synzytiotrophoblast gebildet. Bei der jungen Plazenta befinden sich unter den Synzytio- noch deren Vorgängerzellen, die Zytotrophoblasten. Als zweite Schicht folgt ein mit Bindegewebe gefüllter innerer Zottenraum. Von hier aus trennt nur noch das Kapillarendothel (3. Schicht) das fetale Blut ab. Besonders in den Terminalzotten dünnt die Zytotrophoblastszellschicht im Laufe der Schwangerschaft stark aus, woraufhin sich die fetalen Kapillaren dicht an die Synzytiotrophoblastenmembran legen können. Bis zur 20. Schwangerschaftswoche ist der Ausdünnungsprozess in den Terminalzotten abgeschlossen, sodass fortan das maternale vom fetalen Blut nur noch durch eine 2-4 µm dünne Membran getrennt ist: Synzytiotrophoblasten - Basalmembran – Kapillarendothel. Ihrer Schichtung nach wird diese optimierte Plazentaschranke als synzytiokapilläre Plazentamembran bezeichnet.

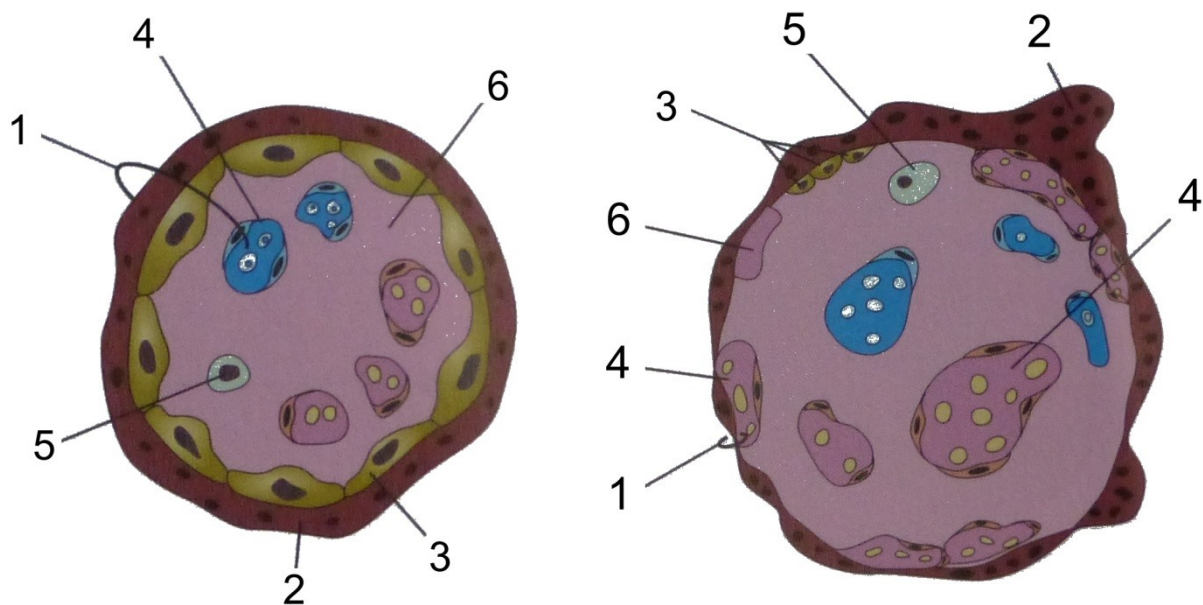


Abbildung 2: Schematisierter Aufbau der frühen (links) und reifen (rechts) Plazentaschranke (12)

Legende zur Abbildung 2: 1 Plazentaschranke; 2 Synzytiotrophoblasten; 3 Zytotrophoblasten; 4 fetale Kapillare mit hohem (rot) und geringem (blau) Sauerstoffgehalt; 5 Plazentamakrophage (Hofbauerzelle); 6 bindegewebige Zottenmatrix.

Der bidirektionale Austausch zwischen Mutter und Kind durch die Plazentaschranke lässt sich auf wenige, grundsätzlich verschiedene Mechanismen zurückführen. Bei der einfachen Diffusion wandern Stoffe vom Ort der höheren Konzentration zum Ort der niedrigeren. Besonders die kleinen Gasmoleküle O_2 und CO_2 , aber auch Glukose-Moleküle wechseln auf diese Weise rasch zwischen den Blutkreisläufen. Selbiges gilt jedoch auch für Inhalationsanästhetika, was besonders beim Geburtsvorgang zu beachten ist (12). Die für die Entwicklung des Fetus unerlässlichen Aminosäuren werden durch aktiven Transport oder Pinozytose (Endozytose von in Extrazellulärflüssigkeit gelöstem

Material) vom mütterlichen ins fetale Blut transportiert. Dieser energetisch aufwendige Prozess ermöglicht es, im fetalen Blut höhere Proteinplasmaspiegel bereitzustellen als im mütterlichen messbar sind. Auch Vitamine und Eisen gelangen durch die Plazentaschranke, wobei letzteres zum Überwinden der Barriere an das mütterliche Plasmaprotein Transferrin gebunden sein muss (12). Bis auf Steroid- und kleine Mengen von Thyroidhormonen ist die Plazentaschranke für mütterliche Hormone weitgehend unpassierbar. Durch Pinozytose gelangen vor allem die Gamma-Fractionen maternaler Immunglobuline in den Fetus, was die Grundlage für den „Nestschutz“ des Neugeborenen legt.

1.4.2 Entwicklung der Plazenta

Bereits am 3. Tag nach der Befruchtung (post conceptionem) der Eizelle (8-Zell-Stadium) differenzieren die totipotenten Blastomeren in eine äußere Zellschicht und in eine innen liegende Zellmasse. Da sich aus der innen liegenden Zellpopulation der embryonale Körper bilden wird, werden diese Zellen als Embryoblasten bezeichnet. Die eng an der Zona pellucida anliegenden Zellen sind Trophoblasten. Ihre Funktion liegt zunächst in der erfolgreichen Einnistung (Implantation) der Blastozyste in die Uterusschleimhaut, gefolgt von der damit einhergehenden Bildung der frühen Plazenta. Dem Präimplantationsstadium folgt nun das Implatationsstadium. Dazu führt der Trophoblast eine Interaktion mit den Zellen des Endometriums durch, wobei fußförmige Fortsätze (Pseudopodien) verdrängend zwischen die mütterlichen Epithelzellen greifen. Durch anhaltende proteolytische Prozesse der Trophoblasten dringt die Blastozyste immer weiter in die Uterusschleimhaut ein und kommt erst am 12. Tag p. c. in der Zona compacta zum Erliegen. Die Trophoblasten differenzieren sich weiter zu Zytotrophoblasten. Hiervon verschmelzen diejenigen untereinander zum Synzytiotrophoblasten, die direkt dem mütterlichen Gewebe anliegen. Am 13.-15. Tag p. c. leitet die Ausbildung von fingerförmigen Synzytiotrophoblastfortsätzen in mütterliche Lakunen zum Stadium der Zottenbildung über. Zunächst besitzen die Primärzotten noch einen Zytotrophoblastkern, in welchen erst Chorionmesenchym (Sekundärzotten) und dann Zottenkapilaren (Tertiärzotten) hineinwachsen. Mit den ersten Zottensprossungen beginnt der utero-plazentäre Kreislauf. Zeitgleich mit den Zottengenerationen bilden sich die Chorion- und Basalplatten.

1.4.3 Throphoblastzellsystem

Die aus der Blastozyste hervorgegangenen frühen Zytotrophoblasten differenzieren sich in zwei grundsätzlich verschiedene Phänotypen: Während sich der extravillöse Trophoblast in der dezidualen Schicht verankert und dort Gefäßumwandlungsprozesse („Remodeling“) veranlasst (15), aggregieren sich die villösen Trophoblasten und verschmelzen zum hormonproduktiven Synzytiotrophoblasten. Diese beiden enddifferenzierten Zellpopulationen bilden den Hauptanteil der Plazentazellmasse.

Abgesehen davon verbleiben über die gesamte Schwangerschaft weiterhin vereinzelt undifferenzierte Zytotrophoblasten im Zottenwerk (16).

In dieser Arbeit werden maßgeblich die Funktionen der Synzytiotrophoblasten untersucht, weshalb diese hier eingehender erörtert werden sollen:

Der komplette intervillöse Raum wird durch eine dünne Schicht von Synzytiotrophoblasten ausgekleidet. Da das mehrkernige Synzytium dabei im direkten Kontakt mit mütterlichem Blut steht, ist es im besonderen Maße in den oben beschriebenen feto-maternalen Austausch involviert (17). Der Synzytiotrophoblast (griech. „trophe“ = Ernährung) ist neben dem Stoffaustausch (18) auch in die Adaptation des maternalen Immunsystems sowie in die endokrine Hormonproduktion involviert. Zwar ist die Aufrechterhaltung des kindlichen Fremdgewebes in der Mutter noch nicht vollends geklärt (12), in vielen Teilaspekten spielen die (Synzytio-)Trophoblasten jedoch eine herausragende Rolle. Um sich vor Immunreaktionen durch maternale Leukozyten zu schützen, exprimieren Trophoblasten sowohl lösliche als auch membrangebundene HLA-G Proteine, die über Bindung an Leukozytenrezeptoren (z. B. ILT2 und ILT4) zur Immunprotektion beitragen (19). Wahrscheinlich werden die in den tieferen Schichten gebildeten, löslichen HLA-G Proteine über Endozytose durch die Synzytiotrophoblastschicht auf die apikale Seite transportiert (20). Um gar nicht erst mit dem mütterlichen Immunsystem in Kontakt zu treten, fehlt den im mütterlichen Blut schwimmenden Synzytiotrophoblasten ein β 2-Mikroglobulin-Anteil seiner Oberflächenerkennungsstrukturen (MHC) (21) (12). Daneben befinden sich auf der apikalen Seite weitere immunmodellierende Proteine wie B7-H1 (20).

Des Weiteren ist die überaus relevante endokrine Funktion der Synzytiotrophoblasten hervorzuheben. Sie ist für die Implantation, die Aufrechterhaltung der Schwangerschaft, den Geburtsvorgang, die Adaptation des mütterlichen Organismus sowie für die zeitgerechte fetale Entwicklung mit verantwortlich (15). Ihrer Struktur nach erfolgt die Einteilung in Protein- und Steroidhormone.

1.4.4 Humanes Choriongonadotropin

Zu den wichtigsten Proteinhormonen der Plazenta gehört das humane Choriongonadotropin (β -hCG), das zuerst von den frühen Trophoblasten der Blastozyste, später vom Synzytiotrophoblasten synthetisiert wird (22). Das Hormon ist bereits 8-10 Tage nach der Ovulation quantifizierbar. hCG greift im Eierstock superagonistisch am Lutein-Hormon-Rezeptor des Corpus Luteum an und sorgt so von Anfang an für die Aufrechterhaltung des Progesteronspiegels und verhindert damit die Regelblutung (Menses). Der β -hCG-Spiegel steigt zunächst exponentiell und erreicht in der 10.-12. Woche seinen Höhepunkt. Ab diesem Zeitpunkt ist die Plazenta ausreichend gereift, um selbst eine

suffiziente Progesteronproduktion zu gewährleisten. Der Wechsel des Progesteronsyntheseorgans wird als luteoplazentärer Shift bezeichnet.

E-3.10 Verlaufskurven von Serum- und Urinkonzentration des β -HCG

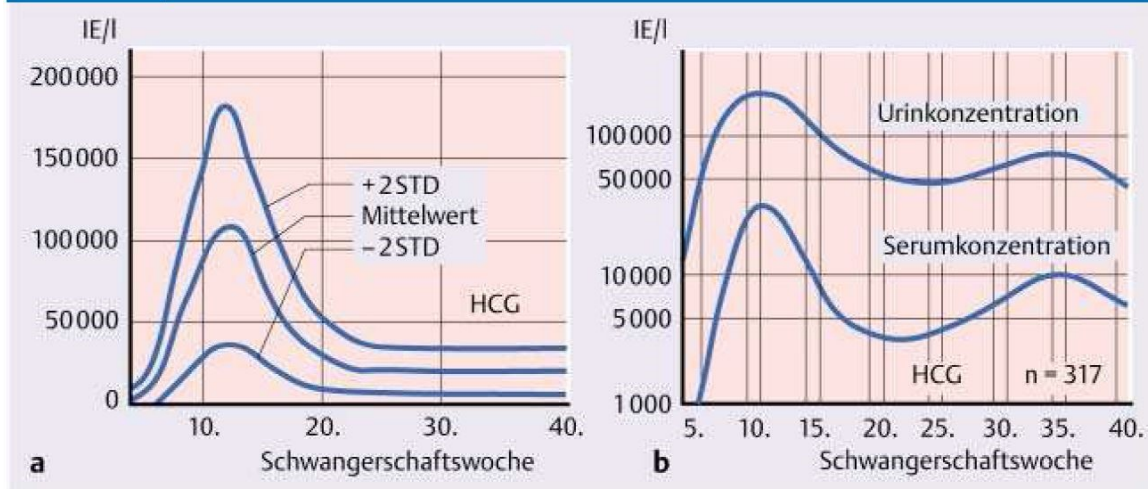


Abbildung 3: β -hCG-Konzentration im Wochenverlauf. Gemessen im Urin (a) und im Serum und Urin (b) (23)

Die Funktion des humanen Choriongonadotropins in der Schwangerschaft beschränkt sich nicht auf das Ovar. Über auto-, intra- und parakrine Mechanismen wird auch die Synzytiotrophoblastdifferenzierung in der Plazenta mitreguliert (15) (18). Zugabe von β -hCG regt in vitro die Differenzierung der Zytotrophoblasten hin zu Synzytiotrophoblasten an (24) (18). Ferner ist hCG in auto- und intrakrine Selbstregulationssysteme eingebunden. Bei niedrigen Spiegeln wirkt das Hormon stimulierend, bei Überproduktion hemmt es die eigene Synthese in den Synzytiotrophoblasten (25). Als Schlüsselenzym dieser Regulationskette konnte eine cAMP-Kinase (GJIC) ausgemacht werden, die über intrazelluläre cAMP-Spiegel die Expression von mRNA steuert (18).

Wie alle Glykoprotein-Hormone setzt sich das hCG-Molekül aus der gruppenkennzeichnenden α -Einheit (bestehend aus 92 Aminosäuren) und der spezifischen β -Untereinheit (145 Aminosäuren) zusammen.

Neben dem humanen Choriongonadotropin (hCG) sind ergänzend zu den placentären Proteohormonen das Chorionsomatotropin (hCS), Chorionthyrotropin (hCT) und Chorioncorticotropin (hCCT) zu erwähnen.

1.4.5 Estrogene

Steroidhormone bilden die zweite Hauptstrukturgruppe an Plazentahormonen. Hierzu zählen im Besonderen das Progesteron sowie die Estrogen-Strukturgruppe, welche im Laufe der Schwangerschaft zunehmend vom Synzytiotrophoblasten synthetisiert wird. Das oben bereits genannte Progesteron ist über die ganze Schwangerschaft hindurch nachweisbar. Das Hormon wirkt

zum einen tonus- und kontraktionshemmend auf die Uterusmuskulatur, gleichzeitig wandelt es das proliferierende Endometrium in sekretorisches um. Durch die Umwandlung von maternalem Cholesterol durch das Enzym Cytochrom P450 cholesterol side chain cleavage (P450scc) synthetisiert der Synzytiotrophoblast Pregnenolon, was im Anschluss durch die 3- β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase zu Progesteron konvertiert wird. Trotz der beachtlichen Produktionsleistung an Steroidhormonen verfügt der Synzytiotrophoblast nicht über das P450 17- α -Hydroxylase-Enzym, mit welchen eine Konvertierung von Pregnenolon zu Estrogenen möglich wäre. Stattdessen ist die Synthese der Steroidhormone Estron, Estradiol und Estriol von Vorstufen wie Dehydroepiandrosteronsulfat (DHEAS) abhängig. Das DHEAS, welches gleichsam jeweils zur Hälfte aus fetaler und maternaler Nebennierenrinde entstammt, wird zunächst hydrolysiert und darauf folgend durch eine synzytiotrophoblastenspezifische P450 Aromastase zu Estrogen konvertiert. Die auf der apikalen Seite des Synzytiotrophoblasten abgegebenen Estrogene führen bei der Mutter zu Anpassungsreaktionen an die Schwangerschaft. So wachsen der Uterus und die Mammæ, das maternale kardiovaskuläre System wird gefördert und auf die plazentäre Mehrdurchblutung vorbereitet. Beim Fetus sorgt besonders das Estradiol für eine funktionelle wie auch morphologische Differenzierung der Synzytiotrophoblasten (18). In vitro kultivierte Synzytiotrophoblasten nehmen nach Estradiolzugabe vermehrt Lipoproteine auf; gleichzeitig steigt die Aktivität des P450scc-Enzyms (26).

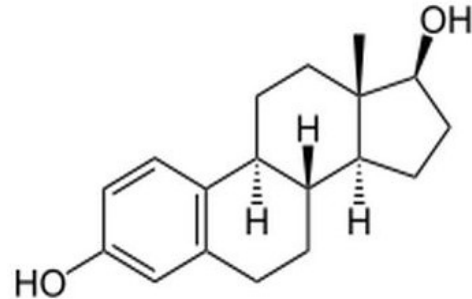


Abbildung 4: Strukturformel Estradiol (1)

1.5 Petroselinum crispum var. Tuberosum

Bereits die Menschen der Antike schätzten die Petersilie (*Petroselinum crispum*) als Gewürz- und Heilpflanze (27). Ursprünglich im Mittelmeerraum wild wachsend, kultivierten die Römer sie bis nach Nordeuropa (28). Sowohl die aromatische Wurzelpetersilie (*Petroselinum crispum* var. *Tuberosum*) als auch die etwas mildere Blattpetersilie (*Petroselinum crispum* var. *crispum*) werden heute in Europa, den USA und weiten Teilen



Abbildung 5: *Petroselinum crispum* fotografiert im Botanischen Garten Rostock

Asiens als Würz- und Suppengemüse angepflanzt (29). Die in dieser Arbeit verwendete Wurzelpetersilie (var. Tuberosum) zeichnet sich durch besonders große Rübenbildung aus, welche bis zu 20 cm in der Länge und 3-5 cm im Durchmesser erreichen kann. Die Rübe ist winterfest. Dabei lagert sich kaum Lignin in die Zellwände ein, sodass keine „Verholzung“ stattfindet (28).

Mit einem Wassergehalt von 88% und im Vergleich zu anderen Wurzelgemüsen hohem Anteil an Proteinen wie auch langkettigen Kohlenhydraten, verfügt die Petersilie eher über einen geringen physiologischen Brennwert. Dafür ist Petersilie ebenso reich an Mineralstoffen (Eisen, Magnesium und Kalium) wie an Vitaminen und Spurenelementen. Neben den Vitamin A, B1, B2, C, E, und K (28) kann aus dem Saft der Petersilienwurzel ein besonders hoher Folsäuregehalt extrahiert werden.

1.5.1 Wirkstoffe und Wirkungen

Auf ihr Trockengewicht bezogen enthält die Wurzel der *Petroselinum crispum* ca. 1,6% Flavonoide und bis zu 0,7% ätherische Öle (30) sowie geringe Mengen (< 0,03%) an Furocumarinen (31).

Zu den Furocumarinen zählen Bergapten (< 0,02%), Oxypeucedanin (0,01%), Isopimpinelin (< 0,01%) und Psoralen (< 0,01%), deren Charakteristikum ein ans Cumarin-Grundgerüst angeschlossener Furanring ist (31). Besonders Oxypeucedanin und Psoralen sind für ihre photosensibilisierenden Eigenschaften bekannt. In hohen Dosen setzen sie die Resistenz der Haut gegen Sonnenlicht und UV-Strahlung herab (32).

In der Petersilie können zwei Hauptderivate der Flavonoide extrahiert werden: Flavone und Isoflavone. Der Literatur nach enthalten 100 g Petersilie 1539.70 mg Genistein (33), welches zur Gruppe der Isoflavone zählt. Mit 510-630 mg pro 100 g frischer Petersilienpflanze stellt Apigenin die größte Flavonfraktion; Luteolin und Quercetin haben nur einen geringen Anteil (34).

Die ätherischen Öle, die maßgeblich das charakteristische Aroma der Petersilie formen, lassen sich in die Stoffgruppen der Phenylpropane und Terpene gliedern. Myristicin (ca. 30-40%) und Apiol (10-20%) bilden die Hauptkomponenten der Phenylpropane; zu den Terpenen zählen Terpinolen, β -Pinen und Limonen. Heute finden die ätherischen Öle der Petersilie in Creme-Lotionen und Parfümen Anwendung (bis zu 0,2% Gewichtsanteil) (35). Der Anteil an Duftstoffen ist in den Samen besonders hoch. In den Blättern und insbesondere in den Wurzelstöcken finden sich vergleichsweise geringe Mengen.

Flavone und Phenylpropane besitzen neben einer moderaten antimikrobiellen (36) und leicht fungiziden (37) Wirkung auch eine antioxidative Komponente (34) (38). In Vitro offenbart Petersilie seine radikalfangende und lipidoxidationstoppende Wirkung, wodurch sie aktuell vermehrt ins Interesse der Lebensmittelchemie rückt (39). Die im Vergleich zu anderen (Lebensmittel-) Antioxidantien moderat ausfallende Wirkung ist hauptsächlich auf die phenolischen Gruppen der Phenylpropane zurückzuführen (38).

Vor allem in der Türkei, aber auch in Indien und Südamerika findet die Petersilienpflanze in der traditionellen Medizin Gebrauch (40) (41). Die Anwendung erfolgt meist als Teeaufguss, durch Dampfinhalation oder durch das Einführen des aufgekochten Kräutersudes in den Vaginaltrakt (42). Die Literatur spricht der Petersilienpflanze zahllose Heilwirkungen zu, die viele Fachbereiche der Medizin umspannen. Besonders gynäkologischen Beschwerden, wie dem prämenstruellen Syndrom (PMS), Amenorrhoe oder Ausflussstörungen, begegnet die Naturheilkunde mit Petersilienextrakten (42). Die Hemmung einer $\text{Na}^+ - \text{K}^+ \text{-ATPase}$ in der Niere bedingt einen osmotischen Wassereinfluss ins Lumen, was schließlich zu einer diuretischen und laxierenden Wirkung der Heilpflanze führt (43) (44). Zwar kann der übermäßige Verzehr zu Flatulenzen (31) führen, in Maßen verzehrt ist die Petersilienpflanze aber magenbekömmlich (27) (43), schleimlösend (31), vermindert das Auftreten von Magenschleimhautläsionen (45) und scheint sogar den Blutdruck zu senken (46). Außerdem wurde in Tierexperimenten gezeigt, dass eine diabetogene Stoffwechsellage von Petersilienextrakten profitiert, da der Blutglukosespiegel sinkt und Langzeitschäden an Organen vermindert ausfallen können (40).

1.5.2 Ist Petroselinum crispum ein Abortivum?

Die Literatur des 18. und 19. Jahrhunderts beschreibt eine weitere Arzneimittelwirkung der Petersilie. Berichten aus dieser Zeit zufolge soll die Petersilienpflanze bereits seit dem Mittelalter zu Zwecken der Fruchtabtreibung benutzt worden sein (27) (47). Frühzeitig wurde das Phenylpropanderivat Apiol ($\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{O}_4$) als auslösende Komponente verdächtigt, da die Substanz bereits 1715 vom Leipziger Apotheker Link in den Samen der Petroselinum beschrieben wurde (27).

Ursprünglich mit der Zielsetzung, ein Heilmittel gegen Malaria zu entwickeln, verfeinerten die beiden französischen Ärzte Homolle und Joret um 1850 die Gewinnung aus den Samen der Petersilienpflanze und nannten den weißlich kristallinen Stoff „Apiol“ (48) (49). Zwar war die Substanz zur Heilung der Malaria wenig geeignet, in weiten Teilen Europas wurden die Apiolderivate fortan jedoch zu Abtreibungsversuchen angewendet (50).

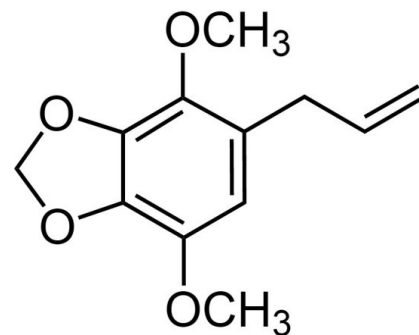


Abbildung 6: Strukturformel Apiol (1)

In seinen Aufzeichnungen führt Merck eine ganze Reihe von Apiolderivaten auf, die es in verschiedensten Darreichungsformen und Mischungen zu erwerben gab (27). Fast alle Präparate wurden aus den Samen der Petersilie gewonnen. Als besonders erfolgreich zum Abort führend und gleichzeitig nahezu nebenwirkungsfrei wird das Präparat „Apiolum viride“ beschrieben (49) (51). Eine benötigte Dosis wird hier allerdings nicht angegeben. Eine weitere Aufzeichnung beschreibt die

Ausstoßung der Leibesfrucht nach der Einnahme von insgesamt nur 1 g über 5 Tage verteilt (52), an anderer Stelle wird über den Verzehr von über 2,5 g Wirkstoff auf einmal berichtet (53).

Im Jahre 1931 traten nach der Einnahme einiger Apiolpräparate plötzlich Lähmungs- und Krampfleiden auf. Die Symptome stiegen peripher aus der unteren Extremität auf und breiteten sich über den Körper, besonders aber über die Extremitäten aus (53). Zu den Polyneuritiszeichen traten weitere Intoxikationserscheinungen wie Übelkeit und Erbrechen hinzu (54). Sogar Todesfälle sind berichtet worden (55); die Erkrankten behielten oftmals irreversible Paresen und Sensibilitätsstörungen (54). Zunächst wurde diese Arzneimittelwirkung dem Apiol zugeschrieben, bis im darauffolgenden Jahr die Niederländer Itallie, Harmsma und Esveld das zur Produktion verwendete Lösungsmittel Triorthokresylphosphorsäureester ausfindig machten. Die Wirkung des Esters ist bereits seit 1920 bekannt, als es der alkoholischen Mixtur „Jamaica Ginger“ zur Umgehung der Prohibition versehentlich zugesetzt wurde (56). Den Beweis erbrachten die drei Niederländer mit Tierexperimenten an Hühnern, Hunden, Kaninchen und Affen, welche nach kurzer Zeit alle oben genannten Symptome aufwiesen (48). Obwohl daraufhin die Apiolpräparate unter Rezeptmittelpflicht gestellt wurden (53), blieb dieses Erkenntnis lange Zeit von der gebrauchenden Bevölkerung unbeachtet, sodass sich der Mythos des abortiven Apiols auch bei den Ärzten verankerte (54).

Aus heutiger Sicht fällt eine Beurteilung möglicher abortiver Eigenschaften von Petroselinum schwer. Bis in die 1960er Jahre ist die Literatur teils widersprüchlich und der Dokumentationsstandard meist wenig aussagekräftig. 1969 zeigten Sharaf et al. eine Tonuserhöhung von Rattenuteri auf. Mit 130 g/kg Körpergewicht waren dazu jedoch verhältnismäßig hohe Konzentrationen von Petroselinum hortense von Nöten (47). Bei einer Diät mit Petersiliensamen gewannen die Uteri kontinuierlich an Gewicht (47). Allerdings regt auch in Wasser gelöster, apiolfreier Petersilienextrakt die Uteri der Ratten zu geringer Gewichtszunahme an, sodass diese Wirkkomponente nicht allein vom Apiol herrührt (57), sondern hierfür auch andere, teilweise hormonaktive Inhaltsstoffe (wie z.B. Flavone) in Betracht gezogen werden müssen.

Aktuell finden sich keine Forschungsarbeiten, die dieses Thema ausreichend behandeln. Vor allem in Südamerika vertrauen Frauen auch heute noch auf die abortive Wirkung der Petroselinumpflanzen. Jedoch ist die Petersilie meist nur eine von vielen Kräutertzutaten der abtreibenden Mixturen. In diesem Zusammenhang wird Petroselinum häufig mit Weinraute (*Ruta graveolens*) und Pflanzen aus der Klasse der Bärlapppflanzen (*Lycopodiopsida*) vermengt, sodass folglich kaum die Möglichkeit besteht, die eintretenden Wirkungen einer einzelnen Pflanze zuzuordnen (41).

1.6 Vergleichssubstanz Zingiber officinale

Ingwer (*Zingiber officinale*) ist weltweit ein integraler Bestandteil der traditionellen Volksmedizin. Seit der Antike wird bei einer einfachen Erkältung zur Linderung der Beschwerden ein Teesudgetränk aus dem Wurzelstock des *Zingiber officinale* verabreicht (58). Ursprünglich war die Ingwerpflanze in den Tropen einheimisch; als Gewürz- und Heilpflanze wird sie heute, ähnlich wie Petersilie, in weiten Teilen der Welt kultiviert.

Auf ihr Trockengewicht bezogen enthält das Rhizom 50-60% Kohlenhydrate, ca. 10% Proteine und 5-10% freie Fettsäuren wie Palmitin-, Öl- und Linolsäuren (31). Außerdem lassen sich 3-8% Rohfaser-Ballaststoffe (59) und bis zu 4% ätherische Öle (60) extrahieren. Ölhärze (auch Oleoresine genannt), wie Gingerol und Shogaol, verleihen dem Ingwer-Rhizom die bekannte stechende Schärfe. Während der Lagerung bilden sich aus dem Gingerol Abbau- und Zerfallsprodukte, die ebenfalls zur Formung des charakteristischen Geschmacks beitragen (30).

Die Indikation für die Arzneidroge Ingwer ist sehr vielfältig und weit gefasst. Einige und bei Weitem nicht alle Beispiele für den in der Literatur angegebenen Gebrauch des Medikamentes in der Volksmedizin sind: Hals-, Glieder- und Muskelschmerzen, Rheuma-, Krampf- und Fieberleiden bis hin zu Wurmbefall (Helminthiasis). Diese lassen sich



Abbildung 7: Blüte eines *Zingiber officinale* im botanischen Garten Rostock

ebenso wie der oben genannte simple grippale Infekt mit Ingwerzubereitungen behandeln (58) (61) (62). Interessanter Weise werden dem Ingwer-Rhizom einige Wirkungen nachgesagt, die denen der *Petroselinum crispum* gleich kommen. So besitzen beide Heilpflanzen eine gewisse antioxidative Wirkkomponente (39) und sind besonders magenbekömmlich (60). Des Weiteren lassen sich vereinzelt Literaturstellen finden, die dem Ingwer abortive Fähigkeiten nachsagen (63) (64). Gegen diese Aussagen sprechen jedoch die vielen in vivo Studien, die keine (65) oder nur geringe Nebenwirkungen erkennen lassen. In vitro moduliert der Extrakt des Ingwer-Rhizoms die Aktivität einiger Cytochromenzyme (66). Vermutlich beruht auf dieser Enzymaktivitätsmodulation die leichte Antikoagulation, die unter gleichzeitiger Einnahme von Warfarin und Ingwer in hohen Dosen zu beobachtet ist (65).

Da Zingiber officinale hier vorrangig als Vergleichssubstanz fungiert, soll in dieser Arbeit nur auf diejenigen Wirkungen eingegangen werden, welche den Themenkomplex mit Petersilie in der Geburtshilfe überschneiden.

Als Antiemetikum hat Ingwer selbst in der schulmedizinischen Gynäkologie und Geburtshilfe seinen festen Platz unter den sonst meist synthetisch hergestellten Medikamenten eingenommen. Besonders effektiv wirkt die antiemetische Arzneidroge bei Schwangeren im ersten Trimenon, die vor allem in den Morgenstunden unter Schwangerschaftserbrechen (Emesis gravidarum, pregnancy-induced nausea and vomiting, PNV) leiden (67) (68). Dabei wirkt die Heilpflanze ebenso effektiv, wie synthetische Antiemetika (Dimenhydrinat) (69) (70). 2013 veröffentlichten Ding et al. eine metaanalytische Auswertung von vier randomisierten, kontrollierten Studien (RCT), aus denen hervorgeht, dass Ingwer in Tagesdosen von 500-1050 mg effektiv die Stärke und Frequenz von Schwangerschaftserbrechen lindert, ohne dabei schädliche Auswirkungen auf Mutter oder Kind zu haben (65).

Ingwer ist wohl eine der am häufigsten angewendeten Heilpflanzen in der Gynäkologie. Demensprechend groß sind die klinischen Erfahrungen, die sich nicht zuletzt auch im umfassenden Literaturangebot zu diesem Thema widerspiegeln.

2 Material und Methoden

2.1 Wurzelsaft- und Extraktherstellung nach Richter/Briese

Nachfolgend wird beschrieben, wie Wurzelsäfte von Petersilien- und Ingwerpflanzen mit möglichst ähnlichen Herstellungsprozessen gewonnen wurden, um die Vergleichbarkeit zu gewährleisten.

Beide Wurzeln stammen aus ökologischem Anbau und wurden ohne Zusätze und ergänzende Stoffe angebaut.

Die Petersilienwurzel wurde im März 2013 in einem Rewe Markt bei Rostock erworben.

Die Ingwerwurzel wurde im April 2013 von einem Bio-Landwirt bei Rostock erworben.

2.1.1 Ingwerwurzelextrakt

Kurzanweisungen:

- Ingwer aus biologischem Anbau.
- Die am Vortag geernteten Ingwerwurzeln waschen und schälen.
- Mit handelsüblichem Entsafter (Philips HR1861/00 Entsafter Aluminium Serie) entsaften.
- Der gewonnene Saft wird ohne Schaumüberstände in 50 ml Tubes abgefüllt und bei 4000 U/min 30 min zentrifugiert.
- Der Überstand wird abgenommen und die Zentrifugierung wiederholt.
- Nach dekantieren in Eppendorf Röhrchen schließt sich eine 30 minütige Zentrifugation mit 13000 U/min an.
- Zusammenführen der Überstände in 50ml Aufbewahrungs-Tube.
- Trockene und verdunkelte Lagerung bei -72°C.
- Für die Versuche wird ein gelagertes Tube aufgetaut.
- Um die Haltbarkeit zu gewährleisten, wird durch einen Spritzenaufsatz (Rotilabo®-Spritzenfilter, steril, 0,22 µm PVDF) steril filtriert.

Von 634 g roher Ingwerwurzel blieben nach Schälen und Waschen noch 510 g. Das Entsaften ergab 290 ml gelblich, leicht milchig-trüben Ingwerwurzelsaft.

2.1.2 Petersilienwurzelextrakt

- Analog zum Ingwersaft möglichst unbehandelte Wurzeln wählen und zeitnah verarbeiten.
- Schälen, waschen und Entsaften.
- Zweimalige Zentrifugation mit 4000 U/min für 30 min in 50 ml Tubes mit anschließendem Dekantieren.
- 30 minütige Zentrifugation in Eppendorf Röhrchen bei 13000 U/min.

- Abfüllen und anschließend lichtgeschützte Lagerung bei -72 °C.
- Vor Ansetzen der Verdünnungen sterile Spritzenfiltration analog zum Ingwersaft.

Von 500 g geschälter Petersilienwurzel verbleiben nach dem Extraktionsprozess 160 g klarer, grün-gelblicher Petersilienwurzelsaftextrakt.

2.1.3 Verdünnungsreihen

Um die Säfte in verschiedenen konzentrierten Dosen testen zu können, werden neben dem unverdünnten Saft drei weitere Verdünnungsschritte (1:2, 1:5, 1:10) hergestellt. Mit DMEM wurden folgende Verdünnungsstufen des Saftes in Mikroreaktionsgefäßen hergestellt:

Verdünnungsstufe	Extrakt-Konzentration %	Saft	DMEM
1:1 (unverdünnt)	100%	1000 ml	0 ml
1:2	50%	500 ml	500 ml
1:5	20%	200 ml	800 ml
1:10	10%	100 ml	900 ml

Tabelle 2: Herstellung der Extrakt-Verdünnungsreihen

Die Mikroreaktionsgefäße werden bei -20 °C lichtgeschützt gelagert. Erst kurz vor Gebrauch werden sie aus dem Kühlfach geholt und bei Raumtemperatur aufgetaut. Nach jeweils 3 Versuchsabfolgen werden neue Mischansätze hergestellt, um Verfälschungen z.B. durch Reaktionen mit Licht, Ausfallerscheinungen beim Gefriervorgang oder einer möglichen Kontamination mit Bakterien vorzubeugen.

2.2 Herkunft der Placentae

Die Versuche wurden durch der Ethikkommission der Universität Rostock genehmigt und zugelassen. Fünf Termplazenten stammen von termingerechten Spontangeburt der Universitätsfrauenklinik Rostock. Nach der Geburt wurden die Plazenten von einem Facharzt begutachtet und bei unauffälligem Befund in ein mit physiologischer Kochsalzlösung (Zusätze: Streptomycin, Heparin-Natrium) befülltes Gefäß überführt. In diesem konnte die Plazenta für maximal 8 h zwischengelagert werden. Das Abruptiogewebe lieferte das Ambulante Operationszentrum der Südstadtklinik Rostock. Die fünf Abruptioplazenten wurden durch eine Curetage entnommen. Es handelt sich um Plazenten in der 10.-12. Schwangerschaftswoche (p. c.). Ohne Zwischenlagerung wurde dieses Gewebe direkt präpariert.

2.3 Trophoblastzellisolierung

2.3.1 Prinzip sowie Auswahl des Verfahrens

Die Trophoblastzellisolierung wird nach Kliman et al. (71) mit leichten Optimierungen der Methode gemäß Jeschke et al. (72) durchgeführt.

Zunächst erfolgt eine mechanische Reinigung und Zerkleinerung des Plazentamaterials, gefolgt von Verdauungsschritten sowie einer Erythrolyse. Danach ist eine Isolierung der Trophoblasten von anderen in der Plazenta vorkommenden Zellen nötig. Die sich anschließende Isolationsmethode richtet sich nach der Menge an erwartetem Zellmaterial.

Die aus dem III. Trimeon stammenden Termplazenten enthalten viel Zellmaterial und eine große Anzahl an Trophoblasten. Bei diesen massereichen Termplazenten findet die Dichtegradientenzentrifugation in einem Percollgradienten Anwendung, welche jedoch mit einem relativ großen Verlust an Trophoblasten einhergeht.

Die alternative Methode beruht auf negativer Selektion auf Ebene einer Antigen-Antikörper-Reaktion (Mikro-Beads), die es ermöglicht alle Zellen, außer der Trophoblastzelllinie, aus der Zellsuspension herauszufiltern. Aus Kostengründen kommt diese alternative Methode jedoch hier nur bei den zellarmen Abruptionplazenten zur Anwendung.

2.3.2 Präparation

Zunächst muss die Plazenta durch eine mechanische Reinigung und Spülung von groben Blutkoageln befreit werden. Mit steriler Pinzette und Schere bzw. Skalpell werden plazentaferne Uterusreste entfernt. Bei Termplazenten sind nun die hervorstehenden Kotyledonen deutlich unter den Eihäuten sichtbar. Sie werden mit der Schere vorsichtig vom fibrinösen Grund gelöst und in NaCl-Lösung gesammelt. Um von Anfang an Verunreinigungen vorzubeugen, sollte auch bei den Abruptionplazenten nur das Material herauspräpariert werden, welches eindeutig der jungen Plazenta zuzuordnen ist. Das gesammelte Plazentamaterial wird in mehreren Schritten in physiologischer Kochsalzlösung gewaschen, bis kaum mehr Erythrozyten ins Waschmedium austreten. Erst danach schließt sich eine mechanische Lösung der Trophoblasten durch Zerkleinerung entlang ihrer Fibrinstrukturen an. Dies gelingt in einer Petrischale unter Zuhilfenahme von Pinzette und Skalpell, mit denen die livide/gräuliche Trophoblastzellschicht jedes einzelnen Kotyledon vom Fibringrund mit der flachen Skalpellseite zerfasert wird. Das erhaltene Zellmaterial wird in einem sterilen 50 ml Tube aufgesammelt. Falls genügend Plazentamaterial vorhanden ist, sollte durch diese Vorgehensweise 50 ml Ausgangsmaterial für die anschließenden Verdauungsschritte gesammelt werden.

Die Gewebesuspension wird für die weiterführende Verarbeitung in eine 500 ml Flasche mit großem, wiederverschließbarem Deckel überführt.

2.3.3 Verdauungsschritte

Es schließen sich drei Verdauungsschritte an, deren Ziel es ist, einzeln vorliegende, von Geweberesten abgelöste Trophoblasten zu gewinnen. Hauptbestandteil dieser Verdauungsvorgänge sind die Enzyme Trypsin und DNase I.

Die im Pankreas und der Leber natürlich vorkommende DNase I spaltet Nukleotide, während die Serinprotease Trypsin an der Verdauung durch enzymatische Trennung von Aminosäuresequenzen beteiligt ist.

Die drei Durchläufe der Verdauungsreaktion gehen mit einem prinzipiell gleichen Ablauf vonstatten. Zunächst werden HBSS-Puffer (z.B. Hank's Salt Solution) mit Antibiotikazusätzen, Trypsin und DNase zu dem Plazentagewebe in die Flasche gegeben. Die Inkubierung erfolgt auf einer Rotationsvorrichtung im Brutschrank (37 °C) für 15 Minuten. Nach der Inkubation sinken innerhalb von 1-2 Minuten die groben, noch unverdauten Gewebstücke als Sedimentschicht auf den Boden der Flasche ab. Durch Anwinkeln der Flasche ist es nun möglich, mit einer Autopipette den oberen Überstand abzunehmen. Das aufgezogene Material wird dann langsam durch eine Gaze (mit 40 µm Lochabstand) gefiltert, sodass zwei 50 ml Tubes mit jeweils 35 ml gefüllt werden. Um die noch fortwährende Trypsinverdauung in den soeben abgefüllten Zentrifugationstubes zu stoppen, wird das Filtrat durch eine lange Spritzenkanüle mit 3,25 ml neonatalem Kälberserum (NBCS) unterschichtet und im Kühlfach bei +8 °C zwischengelagert. Mit dem in der Flasche über gebliebenen Zellgewebe wird die nächste Verdauungsstufe angesetzt, wobei die Vorgehensweise lediglich in den zugegebenen Mengen an Puffer- und Enzymzusatz variiert.

Zusatzmengen der Verdauungsschritte in Kurzanweisung:

Verdauungsschritt	HBSS-Puffer	Trypsin	DNase I
I.	112,60 ml	142,55 mg	5,00 mg
II.	75,00 ml	94,95 mg	5,00 mg
III.	47,50 ml	75,00 mg	5,00 mg

Tabelle 3: Reagenzzugabe pro Verdauungsschritt

Das Resultat der drei Verdauungsdurchgänge sind sechs unterschichtete Filtrate, die mit I-VI beschriftet werden. Bevor mit der Erythrolyse begonnen werden kann, müssen die Filtrate von NCBS und Trypsinresten freigeschrieben werden. Dies gelingt durch Zentrifugation (1800 U/min, 5 min, ohne Bremse, Raumtemperatur) und darauffolgendem Dekantieren.

2.3.4 Erythrolyse

Im hypotonen Milieu sind Erythrozyten sehr anfällig und lysieren besonders schnell bei hypothermer Umgebungstemperatur. Bei der sich anschließenden Erythrolyse wird ein solches Milieu geschaffen, um die in der Zellsuspension verbliebenen Erythrozyten zu eliminieren.

Dazu werden die Zellpellets in den sechs Zentrifugenröhrchen mit 15 ml eiskaltem Aqua destillata aufgeschwemmt und für 3 Minuten kräftig geschüttelt. Durch Zugabe von jeweils 7,5 ml einer 2,7 %-igen NaCl-Lösung bildet sich wieder ein physiologischer Elektrolytgehalt im Medium. Die Zentrifugation mit anschließender Erythrolyse sollte so oft wiederholt werden, bis die Zellpellets in den Zentrifugationsröhrchen blass-rosa erscheinen, jedoch nicht öfter als 3-mal, da jede Erythrolysewiederholung eine erhöhte Mehrbelastung an den Trophoblastzellen zu Folge hat. Nach dem ersten Erythrolysedurchlauf ist es ratsam, jeweils zwei Zentrifugationsröhrchen zusammenzuführen (I+II, III+IV, V+VI) und so die Erythrolysedurchgänge zu beschleunigen. Hierzu werden 5 mg DNase I in 60 ml Puffer gelöst und jeweils 8,75 ml dieser Lösung zu jedem Pellet gegeben, sodass nun zwei Suspensionen in ein Röhrchen zusammengeführt werden können.

Ist die Erythrolyse vollständig abgelaufen, werden nach der Zentrifugation alle Zellpellets in ca. 4 ml DMEM (je nach Pelletgröße) gelöst (ggf. vortexen) und zusammen in ein einzelnes 50 ml Zentrifugationstube überführt.

Zwar liegen die Trophoblasten in der Lösung nun erythrozytenfrei und aus dem Gewebeverbund herausgelöst vor, jedoch befinden sich neben den Trophoblasten immer noch andere Zellen der Plazenta mit im Medium. Die nun folgenden Isolationsverfahren richten sich, wie oben beschrieben, nach der zu erwartenden Zellzahl.

2.3.5 Percoll-Dichtegradientenzentrifugierung

Die Separierung der Zellpopulationen gelingt durch Zentrifugierung in einem kontinuierlich zunehmenden Dichtegradienten. Die Zellpopulationen durchwandern diesen solange, bis sie in der Schicht angelangt sind, welche ihrer charakteristischen Dichte gleicht.

Zur Durchführung muss zunächst der Dichtegradient geschichtet werden. Dieser wird durch Schichtung von sechs abnehmend konzentrierten Percoll-Medien hergestellt.

Die hierfür benötigten Lösungsmengen sind nachfolgender Tabelle zu entnehmen und können in 15 ml Zentrifugationstubes angemischt werden.

Percoll-Konzentration	Percoll-Lösung (90%)	HBSS-Pufferlösung
20%	1,0 ml	3,5 ml
30%	1,5 ml	3,0 ml
40%	2,0 ml	2,5 ml
50%	2,5 ml	2,0 ml
60%	3,0 ml	1,5 ml
70%	3,5 ml	1,0 ml

Tabelle 4: Schichtung des Percoll-Gradienten

Der Dichtegradient im fertig geschichteten Zentrifugationstube sollte von der Oberfläche zum Boden hin zunehmen, also von 20%-Percoll-Lösung an der Oberfläche bis 70% am Grund reichen. Die besten Ergebnisse werden durch langsame Unterschichtung mit einer am Boden angesetzten Punktionskanüle erzielt. Angefangen mit dem 20% Percoll-Medium gelingt die nacheinander durchgeführte Unterschichtung, ohne Luftblasen oder Verwirbelungen zu erzeugen.

Abschließend kann die Plazentazellsuspension vorsichtig mit der Punktionskanüle auf die Oberfläche des Dichtegradienten aufgetragen werden. Die 20 minütige Zentrifugation erfolgt bei 3000 U/min ohne abschließende Bremsung.

Gelingt die Zentrifugation, so liegen die nach ihrer Dichte separierten Zellpopulationen als Banden im Zentrifugationsröhrchen. Mit einer Dichte von 1,048 - 1,062 g/ml sammeln sich die Trophoblastzellpopulationen in der 3. und 4. Bande und werden mit einer Punktionskanüle abgezogen (73).

2.3.6 MACS-Separierungsmethode

Die MACS (Magnetic Activated Cell Sorting)-Methode beruht auf negativer Selektion der trophoblastfremden Zellen. Alle Populationen außer den Trophoblastzellen werden nach der Erythrolyse mit einem Antikörper markiert (Primärantikörper). An den ersten Antikörper bindet im Folgenden ein weiterer Antikörper (Sekundärantikörper), welcher einen magnetischen Molekülanteil besitzt. Beim Durchlaufen einer Magnetsäule werden die magnetisierten Fremdzellen an der festen Phase zurückgehalten, sodass einzig die Trophoblastpopulation mit der beweglichen Phase die Säule passiert.

Konkret fanden folgenden Antikörper der Firma Santa Cruz Biotechnology Anwendung:

- Primärantikörper: MHC class I mouse monoclonal IgG2a
- Sekundärantikörper: Anti-Mouse IgG MicroBeads

Diese Methode ist nicht nur zeitlich aufwendiger, sondern auch wesentlich kostenintensiver, weshalb sie nur bei den zellarmen Abruptionplazenten zum Einsatz kommt.

2.3.7 Zellzählung und Verdünnung des Isolats

Nach der Isolierung schließt sich eine letzte Zellwäsche in der Zentrifuge an (beispielsweise mit Hank's Salt Solution, 1800 U/min, 5 min, ohne Bremse). Das nach dem Dekantieren erhaltene Zellpellet wird in wenigen Millilitern DMEM (je nach Pelletgröße ca. 3-8 ml) aufgelöst.

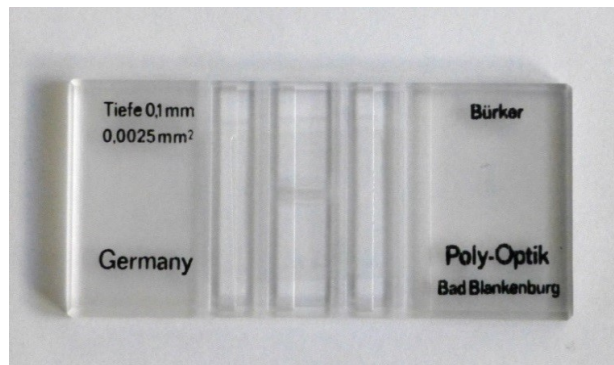


Abbildung 8: Verwendeter Objektträger mit Bürker-Zählkammer

Für die Zellzählung in der Bürker-Kammer (Abbildung 8) wird eine Verdünnung von 1:20 benötigt. Dazu werden 20 µl der Trophoblastzellsuspension, 360 µl Medium sowie 20 µl Trypanblau in einem Mikroreagenzgefäß vermischt. Um eine gleichmäßige Verteilung in der Zählkammer zu erreichen, können mit einer Mikropipette jeweils 10 µl pro Kammerseite gegeben werden. Die Unterscheidung

und Auszählung der vitalen Trophoblastzellen von den übrigen Zellresten gelingt unter dem Lichtmikroskop. Es empfiehlt sich, ein Objektiv mit mindesten 32-facher Vergrößerung zu wählen. Um Verfälschungen der Konzentration zu vermeiden, dürfen nur lebende Trophoblastzellen berücksichtigt werden, bei denen kein Farbstoff ins Zellinnere eingedrungen ist. Pro Bürker-Kammerhälfte müssen 25 Hilfsquadranten (Abbildung 9) ausgezählt werden. Die aus beiden

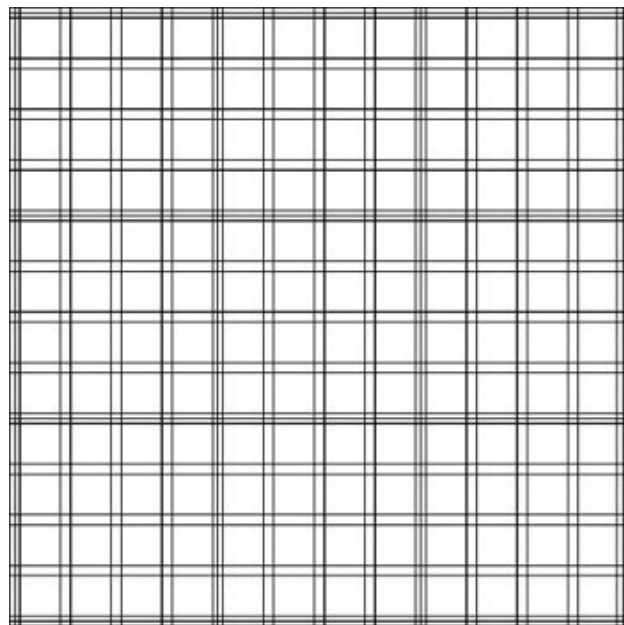


Abbildung 9: Linienschema der Bürker-Zählkammer

Kammerhälften ermittelte Trophoblastzellzahl (2*25 Hilfsquadranten) entspricht der Zellzahl x 10⁴ µl, die in der Verdünnung vorliegt. Eine Multiplikation mit 10 egalisiert den Verdünnungsfaktor. Die durch diese Zellzählung ermittelte Konzentration entspricht der nach dem letzten Isolierungsschritt gewonnenen Trophoblastenkonzentration (Formel 1). Diese muss nun durch Mediumzugabe soweit verdünnt werden, bis die Zellsuspension eine Konzentration von 10⁶ Zellen/ml aufweist.

$$\text{Zellkonzentration im Isolat } \left(\frac{\text{Zellen}}{\text{ml}} \right) = 2 \times (\text{gezählte Zellen aus 25 Quadranten}) \times 10^4 \times 10$$

Formel 1: Berechnung der Konzentration von Trophoblastzellen im Isolat bei Auszählung unter Bürker-Zählkammer

2.4 Testverfahren und durchgeführte Versuche

2.4.1 Grundsätzliches Vorgehen, Kulturanlage und zeitliche Abfolge der Versuche

Für die Versuchsabläufe wird eine Trophoblastzellsuspension mit einer Zellkonzentration von 10^6 /ml definiert. Die Aussaat und Anlage der Zellkulturen geschieht ausschließlich auf Well-Platten. Die Glucose-, pH- und Hormonmessungen erfolgen auf 12er-Well-Platten. Die photometrischen Messungen der LDH- und MTT-Konzentration benötigen jeweils eine 96er-Well-Kulturplatte.

Die einmalig durchgeführte Immunhistochemie erfolgt auf einer 24er-Well-Platte.

Als Kulturmedium dient DMEM mit Zusätzen (0,5% Amphotericin B und 0,2% Streptomycin) sowie 10% fetales Kälberserum (FKS).

Der Brutschrank ist während der Inkubation durchgehend mit 37 °C temperiert; der CO₂-Luftanteil beträgt 5%; wasserdampfgesättigte Atmosphäre (physiologische Bedingungen).

Unter diesen Bedingungen vollzieht sich die Entwicklung der Trophoblastzellen zu Synzytiotrophoblastzellen innerhalb von 72 h - 100 h.

Die Zugaben der Saftextrakte (unverdünnt \triangleq 1:1) bzw. deren Verdünnungsstufen (1:2, 1:5, 1:10) werden so gewählt, dass sie einen Konzentrationsanteil von 1% in der Probe haben. Daneben werden auf derselben Well-Platte Ansätze für den Blindwert (Medium), die Negativkontrolle (Medium + Zellen) und ggf. die Substanzkontrolle (Medium + Extrakt) angefertigt. Die Zugabe der Wurzelextrakte erfolgt bei der „24 h“-Platte (Glucose, pH und oxidativer Stress) sowie dem MTT-Test direkt mit der Aussaat der Kulturen. Wegen des erforderlichen Mediumwechsels nach 24 h kann die LDH-Platte erst danach mit den Wurzelextrakten beimpft werden. Für die abschließende Messung der Hormonproduktion soll dem Trophoblasten zunächst 72 h Zeit zur ungestörten Synzytiumbildung eingeräumt werden. Erst danach wird die Platte mit den Wurzelextrakten beimpft und weitere 72 h inkubiert, bis die Messung der Hormonkonzentration stattfindet.

2.4.2 Statistische Analyse und Literaturverwaltung

Die statistische Auswertung erfolgt mittels des Tabellenkalkulationsprogramm Microsoft® Office Excel 2010 sowie der Statistiksoftware IBM® SPSS Statistics. Zur Signifikanzberechnung wurde der Student'sche T-Test angewendet, wobei ein p-Wert < 0,05 als signifikant definiert ist.

Zur Verwaltung und Erstellung des Literaturverzeichnisses wurde das Computerprogramm Citavi for Windows Version 5.3.1 der Firma Swiss Academic Software® mit einer Campuslizenz verwendet.

2.4.3 Mineralien- und Glucosekonzentration der Extrakte

Die Saftextrakte aus der Ingwerwurzel, sowie Blatt- und Wurzelpetersilie werden zur Konzentrationsmessung der enthaltenen Mineralien, Folsäure sowie Glucose in das medizinische

Zentrallabor Klinikum Südstadt gereicht. Hier werden über Routineverfahren die Konzentrationen von Natrium, Kalium, Kalzium, Chlorid, Magnesium, Eisen sowie Folsäure und Glucose ermittelt.

2.4.4 Pyrolyse-Feldionisations-Massenspektrometrie (Py-FIMS)

Als ökologisches Produkt unterliegt die Zusammensetzung der Ingwer- wie auch der Petersilienwurzel natürlichen Schwankungen, die beispielsweise vom Erntezeitraum abhängig sind. Mit Hilfe der Massenspektrometrie soll verifiziert werden, dass sich die Zusammensetzung der hier untersuchten Wurzeln in weiten Teilen mit denen in der Literatur beschriebenen deckt.

Der Versuch wurde in Zusammenarbeit mit dem Institut für Bodenkunde (Fakultät für Agrar- und Umweltwissenschaften der Universität Rostock) durchgeführt und ausgewertet.

Prinzip:

1912 entwickelte Sir Joseph John Thomson das Verfahren der Massenspektrometrie, mit welchem die genaue Messung von Atommassen gelang (74). Computergestützte Massenspektrometrie als Weiterentwicklung dieses Grundprinzips ermöglicht es uns heutzutage, unbekannte molekular-chemische Zusammensetzungen einer Probe in kürzester Zeit aufzugliedern. Da für diese Technik geringe Mengen unbehandelter Proben ausreichen, um sowohl eine qualitative als auch quantitative Probenanalyse anzufertigen, ist die Massenspektrometrie in der Medizin-, Lebensmittel (75)- und Agra (76)-Labortechnik zu einem bedeutenden Werkzeug avanciert.

In einem Quarzziegel werden 0,3 mg der Probe zunächst in den gasförmigen Aggregatzustand überführt. Die zu diesem Zweck durchgeführte Pyrolyse (griechisch, Pyros = Feuer und Lyso = zersetzen) läuft unter Ausschluss von Sauerstoff in einem Hochvakuum ab, sodass die Moleküle beim Erwärmen von 50 °C bis 650 °C keine weiteren Reaktionen eingehen (77). Die durch das schonende Pyrolyse-Verfahren erhaltenen gasförmigen Analyte gelangen nun in das eigentliche Massenspektrometer, wo sie ihrer Masse und Ladung nach aufgetrennt werden.

Anhand des grundsätzlichen Aufbaus aus einer Ionisationskammer, einem Analysator und schließlich einem Detektor lässt sich die Funktionsweise des Massenspektrometers schildern: Durch ein starkes elektrisches Feld (Feldionisation) verliert das Moleküle ein Elektron – es ist nun ionisiert. Je nach ihren spezifischen Masse-zu-Ladungs-Verhältnissen ($\frac{m}{q}$ auch $\frac{m}{z}$) erfahren die Moleküle im Magnetfeld des Analysators unterschiedliche Ablenkungen und bewegen sich folglich auf verschiedenen Laufbahnen, was zu charakteristischen Auftreffpunkten im Detektor führt (78).

Die Durchführung der Messung im Institut für Bodenkunde verläuft nach Eingabe der Pyrolyseparameter vollständig automatisiert.

Die Auswertung der Massespektren wird anhand von graphisch aufbereiteten Diagrammen vorgenommen. Diese Notwendigkeit ergibt sich aus der enormen Menge an detektierten Molekülen und Molekülfragmenten, die anders nicht überblickbar wären. Die gängigste Diagramm-

darstellungsform ist das so genannte Strichspektrum (siehe Abbildung 10). Dieses x/y-Diagramm ordnet das detektierte Masse-zu-Ladungs-Verhältnis ($\frac{m}{z}$) auf der x-Achse der (auf 100 nominierten) relativen Intensität auf der y-Achse zu (79). Zur vollständigen Interpretation wird zusätzlich das dazugehörige Pyrolyse-Thermogramm benötigt.

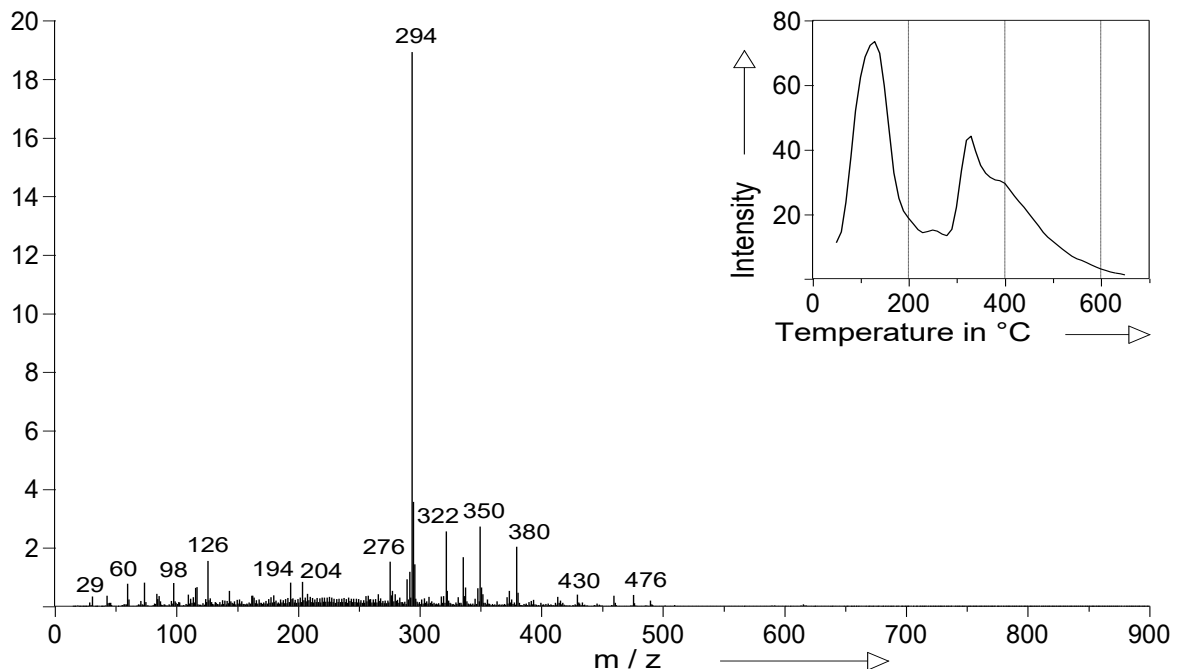


Abbildung 10: Py-FIMS-Spektrum sowie Thermogramm einer Ingwer-Probe

Trotz des schonenden Pyrolyseverfahrens und der Aufbereitung der Rohdaten in Strichspektren, beinhaltet die Abbildung dennoch sehr viele uncharakteristische Ausschläge. Dies beruht teilweise auf einer Fragmentierung der Molekülketten, die sich im Zuge der Herstellung des Pflanzenextraktes nicht vollends verhindern lässt. Hinzu kommen weitere Störparameter wie Isotope und metastabile Molekülzustände, die schließlich die vielen uncharakteristischen Ausschläge zur Folge haben (80).

Aus der Masse lässt sich unter gewissen Umständen die Summen- bzw. Verhältnisformel herleiten, auf die genaue Molekülstruktur kann damit jedoch nur bedingt geschlossen werden. Aus den hier aufgeführten Gründen ist eine vollständige Auswertung erst mit Hilfe komplexer und aufwendiger Computerberechnungen möglich (75).

2.4.5 Lichtmikroskopische Verlaufskontrolle

Mittels Lichtmikroskop (Axiovert 40, Zeiss®) wird nach der Aussaat sowie nach 24h, 48h, 72h, 96h und 144h der Verlauf und Zustand der Zellkultur bewertet. Zur Auswertung erfolgt eine Digitalbilddokumentation (AxioCam MRc; Zeiss®) bei 32- bzw. 40-facher Vergrößerung.

2.4.6 Gewinnen von zellfreiem Überstand

Für folgende Versuche wird Überstand aus den 12er-Well-Platten benötigt:

- Glucosemessung (s. Abschnitt 2.4.7)
- pH-Messung (s. Abschnitt 2.4.8)
- Bestimmung des oxidativen Stresses (s. Abschnitt 2.4.11)
- 17- β -Estradiol Bestimmung (s. Abschnitt 2.4.12.2)
- β -hCG Bestimmung (s. Abschnitt 2.4.12.1)

Trophoblastzellen sind Suspensionszellen. Die in der Suspension schwimmenden Zellen legen sich gegebenenfalls auf die Bodenplatte auf, jedoch wachsen sie dort nicht fest an.

Zunächst wird die 12er-Well-Platte anzentrifugiert (1000 U/min, 5 min), sodass die Zellen sich an der Bodenplatte möglichst fest aggregieren.

Die Zellkultur-Platte wird leicht angewinkelt, mit einer Mikropipette 1 ml pro Well des Überstandes dekantiert und in Mikroreagenzgefäße gegeben. Das Resultat der darauf folgenden Zentrifugation (2500 U/min, 15 min) ist ein klarer Überstand, der für die oben angeführten Versuche genutzt wird.

2.4.7 Glucosekonzentration

Durch die Aufnahme von Glucose aus dem Medium lassen sich grundlegende Vitalitätsparameter der Zellkultur abschätzen. Der Glucosegehalt des Mediumüberstandes wird nach 24h bestimmt, um eine Einschätzung über den Stoffwechsel der frühen Trophoblastzellen machen zu können. Analog hierzu wird nach 96h und 144h verfahren, um den Glucosestoffwechsel der neu gebildeten Synzytiotrophoblasten aus Term- bzw. aus Abortiplazenten zu quantifizieren.

Für diesen Versuch wird zellfreier Überstand benötigt. Hiervon werden 20 μ l zu 1ml Glukose-Systemlösung (Fa. Biosen) in ein Mikroreagenzgefäß gegeben und nach reichlichem Durchmischen zur Auswertung ins hauseigene Labor gereicht (Zentrallabor des Klinikum Südstadt, Südring 81, 18059 Rostock). Im Glukose/Laktat-Automaten (Fa. Biosen) erfolgt zeitnah eine photometrische Bestimmung nach der Glucose-Dehydrogenase-Methode (81):

Bei der Oxidation von β -D-Glucose zu Gluconsäure wird im 1:1 Verhältnis H_2O_2 frei. Diese Reaktion wird durch die Glucose-Oxidase (GOD) katalysiert. Das reaktive H_2O_2 dient in der sich anschließenden Indikationsreaktion zur Oxidation eines Diammoniumsalzes (2,2'-Azino-di-3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure (ABTS)). Das ABTS-Radikal ist photometrisch detektierbar, woraus die Glucosekonzentration ermittelt werden kann.

2.4.8 pH-Messung

Ähnlich wie die Glucosebestimmung dient die pH-Messung der Beurteilung des grundlegenden Zellmetabolismus. Viele Produkte dieses Stoffwechsels fungieren als Protonendonator und haben

somit Einfluss auf das pH-Milieu der Kultur. Daneben können starke pH-Wert-Schwankungen frühzeitig Hinweis auf eine bakterielle Besiedlung der Zellkultur geben.

Die pH-Messung wird als letzter Versuch mit dem restlichen zellfreien Überstand durchgeführt. Nach dem Kalibrieren des Messgerätes werden die Proben nacheinander gemessen. Zwischen den jeweiligen Proben wird die pH-Sonde mit destilliertem Wasser gespült.

Genutzt wurde das digitale pH-Meter Thermo Scientific Orion 3-Star Benchtop der Firma Fisher Scientific®.

2.4.9 MTT- Zellviabilität

Über die Messung der metabolischen Aktivität ermöglicht der MTT-Test eine Einschätzung der Zellviabilität, also des Anteils an lebenden Zellen in einer Zellkultur. Zu Grunde liegt hierbei eine colorimetrische Messmethode.

Prinzip:

Das namensgebende Salz 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) wird nur in vitale Zellen aufgenommen. Sowohl die mitochondriale Succinat-Dehydrogenase, als auch die Glykolyseenzymkaskaden des Endoplasmatischen Retikulums reduzieren den gelben MTT-Farbstoff zu bläulich-violetter Formazan. Letzteres ist im Gegensatz zu MTT nicht mehr wasserlöslich und sammelt sich folglich im Zellinneren an. Das übrig gebliebene gelbe MTT kann abgenommen werden, sodass nun nur noch das Formazan verbleibt, welches im nächsten Schritt durch ein organisches Lösungsmittel zurück ins Medium überführt wird. Durch die Messung der Extinktion bei $\lambda = 570 \text{ nm}$ mit Hilfe eines ELISA-Readers wird die umgesetzte Menge des Formazan im Mediumüberstand ermittelt. Mit dem Extinktionswert kann nun indirekt auf die Glykolyse rate der Zellen geschlossen werden (82).

Kurzzusammenfassung:

- Aussaat von 10^5 Zellen ($\cong 100 \mu\text{l}$) pro Well auf einer 96er-Platte. Hierfür empfehlen sich eine Multipipette und DMEM + 10% FKS + Zusätze als Medium (siehe Materialliste 8).
- Zugabe von $1 \mu\text{l}$ /Well Wurzelsaftextrakt ergeben 1%-ige Proben.
- Inkubation für 24 h unter Brutschrankbedingungen.
- Zugabe von $10 \mu\text{l}$ /Well der frisch aufgetauten MTT-Reagenz 1 (gelbes MTT-Salz).
- 4 h Inkubation.
- Zugabe von $100 \mu\text{l}$ /Well MTT-Reagenz 2 (Lösungsmittel).
- 24 h Inkubation.
- Messung der Extinktion im ELISA-Readers (Extinktion: $\lambda = 570 \text{ nm}$; Referenz: 650 nm).

Auswertung:

$$\text{Zellviabilität (in \%)} = \frac{\text{Extinktion}_{\text{Probe}} - \text{Extinktion}_{\text{Med}}}{\text{Extinktion}_{\text{Med+Zellen}} - \text{Extinktion}_{\text{Med}}} * 100$$

Formel 2: Berechnung der Zellviabilität in % vergleichend zu Medium + Zellen

Die gemessene Extinktion des Mediums wird als Hintergrundwert („Blindwert“) von allen Proben abgezogen. Als Negativkontrolle dient der Wert von Medium + Zellen, welcher auf 100% normiert wird. Zu dem so ermittelten Wert werden die Ergebnisse aller anderen Proben in Relation gesetzt.

2.4.10 LDH-Zytotoxizität

Bei dieser fotometrischen Messmethode dient das ins Medium freigesetzte Laktatdehydrogenase-Enzym (LDH) als Parameter des am Trophoblasten aufgetretenen Zellschadens. Zwar macht dieser unspezifische Parameter keine Aussage über die Genese, dennoch gewährt die LDH-Konzentration die Möglichkeit einer grundsätzlichen Einschätzung des Zellschadens.

Prinzip:

Die durch Wurzelextrakte geschädigten oder untergegangenen Trophoblasten geben ihre zytoplasmatische Laktatdehydrogenase ins Medium ab. Die Konzentration des im Mediumüberstand enthaltenen LDHs wird indirekt über die Messung der Enzymaktivität bestimmt. Letztere kann mit Hilfe der LDH-Testsubstanzen durch zwei gekoppelte, enzymkatalysierte Reaktionen quantifiziert werden:

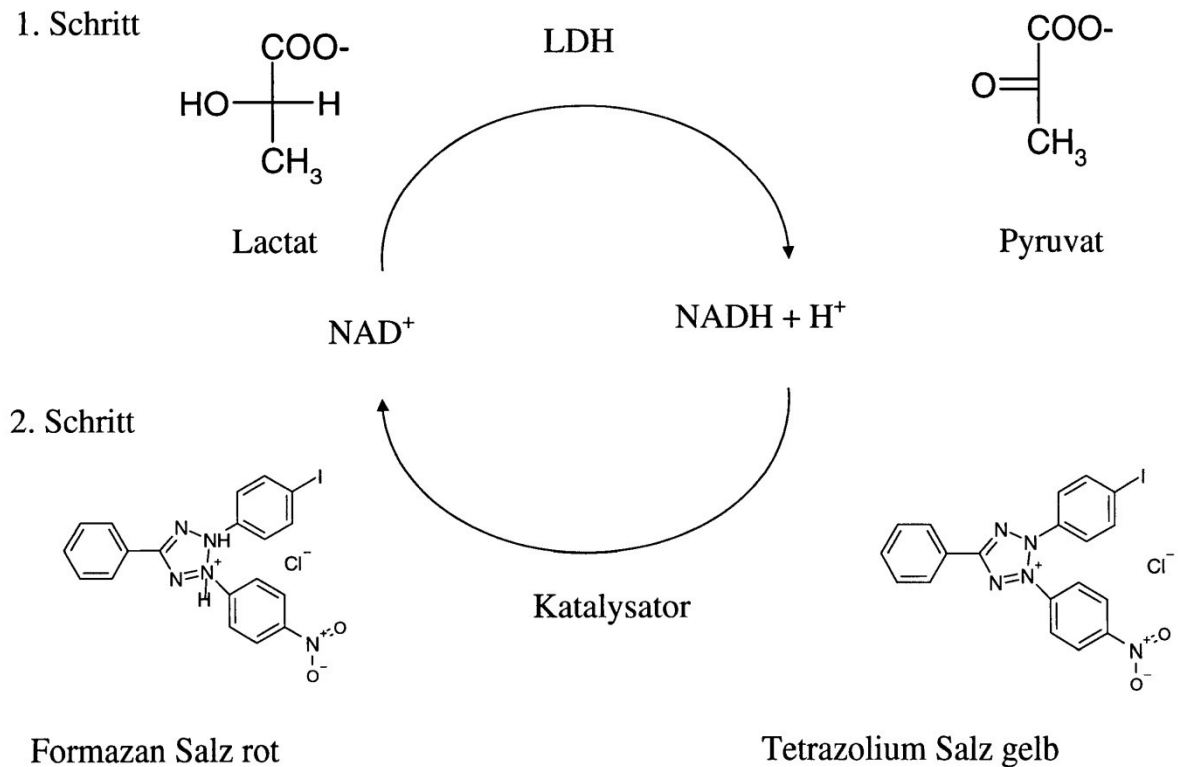
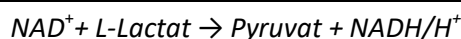


Abbildung 11: Farbreaktion des LDH-Kits (83)

Zunächst katalysiert die Lactatdehydrogenase die Oxidationsreaktion von L-Laktat zu Pyruvat, wobei der Cofaktor NAD⁺ zu NADH/H⁺ reduziert wird (2. Schritt). (84)

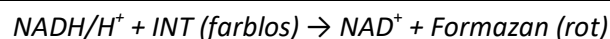
Die *LDH katalysierte Reaktion* läuft gemäß folgender Formel ab (vgl. „1. Schritt“ in Abbildung 11):



Formel 3: LDH katalysierte Reaktion

Das in der Testreagenz enthaltene Enzym Diaphorase verwendet nun das soeben produzierte NADH/H⁺, um den Redox-Farbstoff Triphenyltetrazoliumchlorid (INT) in seinen reduzierten Zustand (Formazan) zu überführen. Die Reaktion des INT zu Formazan geht mit einem Farbumschlag vom Farblosen ins Rote einher. (84)

Die *Diaphorase katalysierte Reaktion* läuft entsprechend folgender Formel ab (vgl. „2. Schritt“ in Abbildung 11):



Formel 4: Diaphorase katalysierte Reaktion

Wie beim MTT-Testverfahren ist auch hier die umgesetzte Menge des roten Formazans mit Hilfe eines ELISA-Readers quantifizierbar, wobei sich das Extinktionsmaximum bei $\lambda = 492 \text{ nm}$ befindet.

Die Konzentration des entstandenen Formazans korreliert mit der Ansammlung des LDHs, welches wiederum im festen Verhältnis zum Ausmaß an geschädigten Zellen im Kulturmedium steht.

Durchführung:

In diesem Versuch wurde das *Cytotoxicity Detection Kit (LDH)* der Firma Roche Diagnostics angewendet, welches nicht nur das Salz INT (Kit II), sondern auch das für die Kopplung der Reaktionen notwendige Kit I mit Diaphorase/NAD⁺-Gemisch enthält.

Da dem Nährmedium zu 10% Fetales Kälberserum (FCS) zugesetzt ist, muss ein Mediumwechsel am zweiten Tag erfolgen, um eine gegebenenfalls erhöhte LDH-Hintergrundaktivität auszuschließen (85).

Für die Auswertung des LDH-Versuchs sind drei weitere Kontrollen anzufertigen.

- Eine zellfreie, nur mit Medium gefüllte Versuchsreihe beschreibt den Blindwert.
- Eine Low-Control enthält Medium + Zellen.
- Der High-Control ist außerdem das nichtionische Tensid Octoxinol 9 zugesetzt (besser bekannt als „Triton X-100“).

Kurzanweisungen:

Aussaat:

- Analog zur MTT-Platte werden 100 µl/Well Zellsuspension in 96er-Well-Platten ausgesät (10⁶ Zellen/ml in DMEM + Zusätze + 10% FKS).
- Neben den Proben werden Low- und High-Control mit Trophoblastsuspension angesetzt.
- 24 h Inkubation unter Brutschrankbedingungen.
- Mediumwechsel auf 1% FKS:
- Gesondertes Medium für die Tritonkontrolle ansetzen (Triton in Medium 1:100 mischen und reichlich vortexen).
- Abzentrifugieren der Zellkulturplatten (1000 U/min, 5 min).
- Abnehmen des Mediumüberstandes, ohne dabei die Zellen von der Bodenplatte abziehen.
- Proben – Auffüllen von 198 µl/Well mit FKS-reduziertem Medium (DMEM + Zusätze + 1%FKS) + Zugabe von 2 µl/Well Probesubstanz (\cong 1%).
- Low-Control – Zugabe von 200 µl/Well FKS-reduziertem Medium.
- High-Control – 200 µl/Well Tritonkontrollmedium.
- 24 h Inkubation.

Messung:

- Lichtgeschütztes Ansetzen der Testreagenz durch Mischen von Diaphorase/NAD⁺-Mixtur (Kit I) mit INT (Kit II) im Verhältnis 1:46.
- Abzentrifugieren der Zellkulturplatten (1000 U/min, 5 min).

- Von den Platten je 100 µl/Well Überstand abnehmen und auf eine neue 96er-Well-Platte geben.
- Hierauf jeweils 100 µl/Well der eben angesetzten Testreagenz geben (Multipipette) und im Dunklen inkubieren. Nach 10-20 min ist die Tritonkontrolle sichtbar rötlich gefärbt.
- Abstoppen der Reaktion mit 50 µl/Well mit 1 mol/l HCl (Multipipette).
- Auswertung im ELISA-Reader bei $\lambda = 490 \text{ nm}$ Extinktionsmaximum und 620 nm Referenzwellenlänge.

Auswertung:

Der im Medium gemessene Blindwert wird von allen Proben abgezogen. Da auch unbehandelte Trophoblastzellen ständig eine kleine Menge LDH-Enzym in das Medium freisetzen, wird die Enzymaktivität der Low-Control (Medium und Zellen) von den Proben und der High-Control abgezogen und die Zytotoxizität der Low-Control mit 0% definiert. Der High-Control wird zu 1% Octoxinol 9 (Triton X-100) hinzugesetzt, welches durch Herauslösen von Membranproteinen eine Lyse aller Zellen bewirkt. Dieses nichtionische Tensid eignet sich hierfür besonders, da Triton Proteine nicht denaturiert und somit auch die Enzymfunktion der Laktatdehydrogenase unangetastet bleibt (86).

Die gemessene Enzymaktivität der vollständig lysierten High-Control-Zellkultur ist gleichzusetzen mit einer Zytotoxizität von 100%. Die im ELISA-Reader bestimmten Extinktionswerte der Proben werden zu denen der High-Control in ein prozentuales Verhältnis gesetzt, woraus sich folgende Formel zur Berechnung der Zytotoxizität ergibt (87):

$$\text{Zytotoxizität (in \%)} = \frac{\text{Extinktion}_{\text{Probe}} - \text{Extinktion}_{\text{Low-Control}}}{\text{Extinktion}_{\text{High-Control}} - \text{Extinktion}_{\text{Low-Control}}} * 100$$

Formel 5: Berechnung der Zytotoxizität in % vergleichend zu Triton X-100

2.4.11 H₂O₂-Konzentration (Oxidativer Stress)

Chemisch gesehen ist jedes Material, das Elektronen aufnehmen kann, ein Oxidationsmittel. Richtet sich diese Oxidationsreaktion gegen körpereigene Gewebe (Lipide, Proteine, DNA), so werden diese Oxidantien als reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygen species, ROS) bezeichnet. Je nachdem, ob sie ein unpaares Elektron in ihrer Schale aufweisen oder nicht, findet die Klassifikation in Radikale (O₂^{·-}, OH[·], NO[·], ROO[·]) bzw. Nichttradikale (H₂O₂, ROOH, O₃) statt.

Im gesunden Zellmetabolismus ist die Bilanz aus pro- und antioxidativen Effekten ausgeglichen. Oxidativer Stress kennzeichnet einen Zustand, bei dem oxidative Prozesse die reduktiven (antioxidativen) Kapazitäten des Organismus überwiegen. Die auf molekularer Basis ablaufenden

DNA-Modifikationen, Protein- und Membranlipidoxidationen resultieren auf Ebene der Zellen in Funktionsabwandlungen, wie der Modifikation von Signaltransduktionsprozessen, Zytokin-metabolismus (88) und Enzymaktivitäten oder der Fehlregulierung von Rezeptoren. Alterung, Degeneration, Entzündung und Mutationen entwickeln sich als Langzeitfolgen solcher oxidativen Belastungen (89).

Bemerkenswert, dass gerade die empfindlich erscheinende Plazenta hohe Konzentrationen von reaktiven Sauerstoffspezies aufweist (90). Der Herkunft nach unterscheidet sich exogene Genese (Strahlung, Umweltgifte, Rauchen, Medikamente) von endogener Genese. Durch die erhöhte mitochondriale Aktivität läuft die Reduktion des molekularen Sauerstoffs nicht vollständig ab. 2-3% der Elektronen entgleiten dem vorgesehenen Pfad der mitochondrialen Elektronen-Transport-Kette, wodurch $O_2^{\cdot-}$ entsteht, was durch Anschlussreaktion weitere ROS-Bildung zur Folge hat (91). Insbesondere im minderperfundierten Gewebe steigt durch Sauerstoffmangel die oxidative Last an.

Wie viele andere Gewebe auch verfügt die Plazenta über reduktive (antioxidative) Schutzsysteme. Dazu gehören Mn- sowie Cu/Zn-Superoxiddismutasen, Katalase, Gluthation, Gluthationperoxidase, Gluthation-S-Transferase, Thiol-/Disulfidoxidoreduktasen ebenso wie Ascorbinsäure und Tocopherol (Vitamin C und E) (90) (92). Der Trophoblast scheint in die Regulation einiger dieser Enzymsysteme direkt eingebunden zu sein. Einem Überangebot von Sauerstoff und damit einem Rückgang der oxidativen Last begegnet der Trophoblast in vitro mit einer verminderten Expression der Mn-Superoxiddismutase (90). Ferner scheinen nicht nur Trophoblastenproliferation und Synzytiumbildung, sondern auch die Gefäßbildung der Plazenta durch oxidative Prozesse beeinflussbar zu sein (90). Bei der humanen Chorionkarzinom-Zelllinie JEG-3 nimmt oxidativer Stress in vitro sogar auf die Hormonproduktion von hCG Einfluss (93).

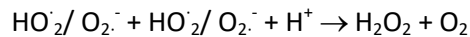
Überwinden nun die oxidativen Effekte die Schutzsysteme der Placenta, kann dies das Risiko auf Präeklampsie steigern oder gar den vorzeitigen Abbruch der Schwangerschaft bedingen (90).

Wie bereits oben angeführt ist die Petersilie nicht nur wegen ihrer hohen Folsäurekonzentration beachtenswert. Hinzu kommt, dass einige ihrer Inhaltsstoffe anti-oxidative Effekte aufweisen sollen. Vorrangig sind hier die phenolischen Molekülgruppen der Phenylpropane zu nennen, jedoch tragen in einem geringeren Maße auch die vielfältigen Flavonoidanteile zu den reduktiven Eigenschaften bei.

Prinzip:

Mit Hilfe des BioVision® Hydrogen Peroxide-Assay (94) soll die absolute H_2O_2 -Konzentration im Überstand der Proben quantifiziert werden.

Die meist aus dem Komplex III der Elektronen-Transport-Kette stammenden $O_2^{\cdot-}$ Radikale sind äußerst kurzlebig; pH-abhängig reagieren sie in kürzester Zeit über Zwischenschritte zu HO_2^{\cdot} und schließlich zu H_2O_2 weiter:



Formel 6: Wasserstoffperoxid-Genese aus Sauerstoffradikalen

Das entstandene Nichtradikal Wasserstoffperoxid trägt durch fortschreitende Reaktionen (z.B. Lipidkettenoxidation) zur Bildung weiterer reaktiver Sauerstoffspezies maßgeblich bei.

Die Bestimmung des oxidativen Stresses soll hier anhand der colorimetrisch gemessenen H_2O_2 -Konzentration erfolgen. Im Vergleich zu den kurzlebigen, hochreaktiven Radikalen ($\text{O}_2^{\cdot-}$, OH^\cdot , ROO^\cdot ...) ist die H_2O_2 -Konzentration als verhältnismäßig konstanter Wert für den oxidativen Stress im System zu beurteilen.

Das BioVision® Hydrogen Peroxide-Assay liefert eine Meerrettich-Peroxidase sowie das Chromogen OxiRed. Daneben werden 100 µl des gewonnenen zellfreien Überstands benötigt. Mit Hilfe des darin enthaltenen H_2O_2 setzt die Meerrettich-Peroxidase das OxiRed Chromogen in einen roten Farbstoff um. Das Färbeprodukt entsteht proportional zur vorhandenen Wasserstoffperoxidkonzentration und kann mit dem ELISA-Messgerät bei $\lambda_{\text{max}} = 570 \text{ nm}$ gemessen werden. Kalkulierung einer Standardkurve ermöglicht die Ermittlung der absoluten H_2O_2 -Probenkonzentrationen.

Durchführung:

Bei den Versuchsdurchläufen werden von allen Proben und Kontrollproben 100 µl des zellfreien Überstandes abgenommen, beschriftet und bei -72°C lichtgeschützt eingelagert. Die spätere Durchführung der H_2O_2 Messung anhand der gesammelten Proben erübrigt die wiederholte Aufstellung einer Standardkurve.

Zur Anfertigung der Standardkurve soll in einem 96er-Well die H_2O_2 -Standardkonzentrationen von 0, 1, 2, 3, 4, 5 nmol / Well pipettiert werden:

- Um 10 mM H_2O_2 -Standardlösung zu erhalten, müssen 870 µl Aqua dest. zu 10 µl der 0,88 M H_2O_2 -Ausgangslösung gegeben werden.
- Da der Versuch 0,1 mM H_2O_2 -Standardlösung benötigt, werden erneut 10 µl der 10 mM Lösung mit 990 µl Aqua dest. gemischt.
- In doppelter Ausführung soll nun damit eine Reihe an Wells (0, 10, 20, ... 50 µl) gefüllt werden, wobei das nächste Well um jeweils 10 µl mehr H_2O_2 -Standardlösung befüllt wird.
- Durch die beiliegende Assay-Pufferlösung, mit der die Reihen bis auf 50 µl aufgefüllt werden, bilden sich die nötigen Standardkonzentrationen von 0, 1, 2, 3, 4, 5 nmol H_2O_2 / Well.
- Anschließend die weiteren Wells mit jeweils 50 µl der aufgetauten Proben pipettieren.
- Pro Well 50 µl Reaktionsgemisch ansetzen, bestehend aus: 46 µl Assay-Pufferlösung, 2 µl OxiRed-Lösung, sowie 2 µl Meerrettich-Peroxidase-Lösung.
- Zu jedem Well (Proben + Standardkontrollen) 50 µl Reaktionsgemisch pipettieren.

- Inkubation für 10 min bei RT.
- Messung im ELISA-Reader bei $\lambda = 570 \text{ nm}$.

Auswertung:

Der Hintergrundwert wird egalisiert, indem der gemessene Wert der 0 nmol H_2O_2 -Konzentration von allen übrigen Messwerten subtrahiert wird. Unter Berücksichtigung der ermittelten Standardwerte wird unter Zuhilfenahme des Computerprogramms Microsoft® Office Excel eine Standardkurve kalkuliert. Diese ermittelte Kurvenfunktion ermöglicht es nun, jedem Farbstoffwert die entsprechende H_2O_2 -Konzentration zuzuordnen.

2.4.12 Hormonkonzentration

2.4.12.1 *humanes Choriongonadotropin (β -hCG)*

Wie zur Glucosebestimmung wurden auch für die β -hCG Messung die Dienstleistungen des medizinischen Zentrallabors der Klinik Südstadt in Anspruch genommen. Benutzt wurde das Total β -hCG Assay-Kit der Firma Access Immunoassay System®.

Wie bereits beschrieben steigt die β -hCG-Konzentration in der Frühschwangerschaft rapide an und fällt ab dem Erreichen des Höhepunktes um die 10-12. Woche wieder stetig ab. Aus diesem Grund wird angenommen, dass Termplazenten aus der 42. SSW kaum aussagekräftige Ergebnisse liefern können, was die Termplazenten aus diesem Versuchsablauf ausschließt. Der Entnahmezeitpunkt des Abruptiomaterials (10.-12. Woche p. c.) fällt hingegen in die Plateauphase der hCG-Produktion.

Prinzip:

Das Messverfahren zur β -hCG Konzentrationsbestimmung beruht auf einem nicht-kompetitiven Immunassay, auch Sandwich-Assay genannt, mit darauf folgender Chemolumineszenzmessung. Diese Methode zeichnet sich durch ihre hohe Sensitivität aus. Zu diesem Verfahren werden zwei verschiedene Antikörper benötigt, die nicht dieselbe Bindungsstelle aufweisen, also nicht untereinander konkurrieren. Ziel des Primärantikörpers ist die Immobilisierung des Antigens in der festen Phase. Konkret wird in diesem Experiment als Primärantikörper ein paramagnetischer Ziege-anti-Maus-IgG: Maus monoklonal anti- β -hCG Antikörper verwendet, welcher im Magnetfeld die hCG-Moleküle an die feste Phase bindet, während alle anderen Substanzen der Probe in der flüssigen Phase ausgespült werden. Der Sekundärantikörper dient zur eigentlichen Nachweisreaktion. Hier wird ein mit alkalischer Phosphatase gekoppelter Kaninchen-anti- β -hCG-Antikörper verwendet. Lumi-Phos 530® ist das chemilumineszierende Substrat dieser Phosphatase. Wird es zugesetzt, so entsteht bei der Umsatzreaktion Licht. Dabei ist die gemessene Lichtintensität proportional zur β -hCG-Konzentration (95).

2.4.12.2 17- β -Estradiol

Der im Überstand gemessene Estradiolgehalt lässt direkte Rückschlüsse auf die Hormonsyntheseleistung der Synzytiotrophoblasten zu. Dies spiegelt eine der grundlegenden Trophoblastzellfunktionen wider, weshalb dem Versuch in der abschließenden Bewertung ein besonderer Stellenwert zukommt.

Für die Bestimmung des Estradiolgehalts wurden die Dienstleistungen des Labors PRIMACYT in Anspruch genommen:

PRIMACYT Cell Culture Technology GmbH, ansässig in der Hagenower Straße 73 in 19061 Schwerin.

Zur quantitativen Messung wird das ARCHITECT Estradiol Reagenzienkit 7K72 der Firma Abbott Laboratories verwendet.

Wie bei der hCG-Messung beruht das Verfahren auf einer Antikörperselektion mit darauffolgender Chemolumineszenzmessung (CMIA). Der paramagnetische Primärantikörper (Kaninchen, monoklonal) richtet sich gegen Estradiol und fixiert an der festen Phase. Das an den Sekundärantikörper gebundene Akridinium-Konjugat katalysiert nach Zugabe der Triggerlösung die Chemolumineszenzreaktion. Die detektierte Lichtmenge verhält sich proportional zur Estradiolkonzentration (96).

2.4.13 Immunhistochemie

Die gewonnenen Zellen sollen nun mit einer immunhistochemischen Färbung eindeutig identifiziert werden. Dazu werden mit Hilfe eines Peroxidase-Kits sowohl das Cytokeratin 7 wie auch ein Estrogenrezeptor auf den Trophoblasten indirekt lichtmikroskopisch dargestellt.

Prinzip:

Die indirekte Nachweismethode beruht zunächst auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion. Die Affinität des Primärantikörpers richtet sich dabei allein auf ein bestimmtes Gewebemerkmale (Epitop). An diesen ersten Antikörper, der die nachzuweisende Struktur markiert, bindet nun ein Sekundärantikörper, welche wiederum mit einem Peroxidase-Enzym gekoppelt ist. Dieses Enzym katalysiert das zugegebene Substrat (LinRed) in einen bräunlich-roten Farbstoff.

Cytokeratin 7 (CK-7) ist ein Protein, welches im Aufbau der Intermediärfilamente aufzufinden ist. Es fungiert hier als ein spezifisches Merkmal der Trophoblastzelle und bietet sich deshalb zur Identifizierung besonders gut an (97) (98). Ergänzend soll auch der humane β 1-Estrogenrezeptor immunhistochemisch illustriert werden (99).

Bereits in der Probe vorhandene Peroxidase-Aktivität oder unspezifische Antikörperbindungen resultieren rasch in falsch-positiven Ergebnissen, was die Negativkontrolle in der Immunhistochemie unabdingbar macht. Falsch-positive Resultate sollen ebenfalls durch Behandlung mit Wasserstoffperoxid und Pferdeserum unterdrückt werden.

Durchführung:

Als Primärantikörper wird in diesen Versuch „Monoclonal Mouse Anti-human CK-7“ von der Firma Dako® bzw. „Mouse Anti-human Estrogen-Rezeptor-Beta-1“ von Serotec® verwendet.

Das zusätzlich erforderliche Pferdeserum und die Kaninchen Anti-Maus-Antikörper werden aus dem Peroxidase-Kit „ImmPress-Reagent“ der Marke Vectorlabs® entnommen.

Vorgehensweise für den CK-7 Nachweis in Kurzanweisung:

- Anlegen der Zellkulturen auf 24er-Well-Platte.
- Jeweils für Probe und Kontrolle ein Well mit 300 µl Zellsuspension (10^6 Zellen/ml) füllen.
- Inkubation von 144 h unter Brutschrankbedingungen.
- Durch Zentrifugation (5 min bei 1000 U/min) Aggregation der Zellen an der Bodenplatte.
- Vorsichtiges Abnehmen des Überstandes.
- Fixierung der Zellen mit Formafix 4% für 30 min.
- 3 x Waschen (Anzentrifugieren (5 min bei 1000 U/min), Abnehmen des Überstands, Auffüllen mit PBS).
- Deaktivierung fremder/endogener Peroxidase-Aktivitäten durch 30 minütige Inkubation mit 0,3% H_2O_2 .
- 3 x Waschen.
- Blockierung unspezifischer Bindungen des Primärantikörpers durch Zugabe von 200 µl Pferdeserum.
- 20 min Inkubation bei RT.
- Waschen, außer Negativkontrolle.
- Zugabe des Primärantikörpers (Dako Monoclonal Mouse Anti-human CK-7), nicht in Negativkontrolle.
- Über die Nacht Inkubation im Kühlschrank.
- Abnahme des Überstandes.
- 3 x Waschen.
- Zugabe des Sekundärantikörpers (4 Tropfen bzw. 200 µl/Well) in beide Wells.
- Inkubation 30 min.
- 3 x Waschen.
- Zugabe von 200 µl/Well Peroxidase-Substrat-Lösung LinRed.
- 5-30 min Inkubation im Dunkeln.
- Abnehmen des Überstandes.
- Abstoppen mit Leitungswasser.
- Dokumentation.

Die Durchführung mit dem Primärantikörper gegen den β 1-Estrogenrezeptor erfolgt analog hierzu.

Auswertung:

Unter dem Lichtmikroskop werden sowohl Probe als auch Negativkontrolle durch Digitalaufnahmen dokumentiert.

3 Ergebnisse

Ausgewertet werden Zellkulturen, die mit Verdünnungsreihen von Ingwer- oder Petersilienwurzelsaft beimpft wurden. Je nach Versuchsaufbau wurden die Verdünnungsproben mit den Werten aus „Medium und Zellen“ oder anderen Kontrollansätzen (beispielsweise Triton-Kontrolle) verglichen. Substanzproben (Medium + Extrakte) sollen Verfälschungen aufdecken, die durch Wechselwirkungen zwischen den Versuchsreagenzien und den Extrakten im Medium entstehen und sich nicht auf die Einwirkung der Extrakte auf die Zellen zurückführen lassen.

3.1 Folsäure- Mineralien- und Glucosekonzentration der Extrakte

Die im Zentrallabor durchgeführten Konzentrationsmessungen sollten zunächst einen Überblick über die Vergleichbarkeit der Extrakte geben. Aus größeren Unterschieden zwischen den zugegebenen Extrakten (beispielsweise bezüglich der Glucosekonzentration) können Veränderungen (pH-Abfall durch saure Metaboliten) hervorgehen, die unabhängig vom Zellmetabolismus sind und deshalb zur fehlerhaften Interpretation der Ergebnisse verleiten könnten.

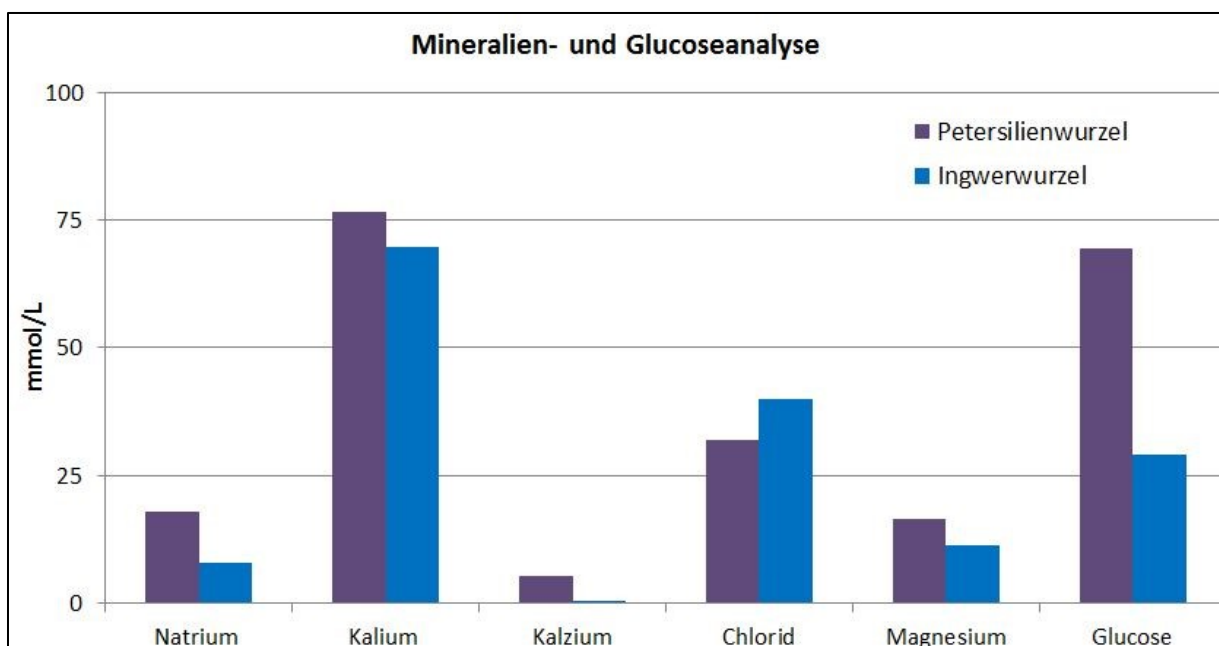


Abbildung 12: Mineralien- und Glucosekonzentration der unverdünnten Extrakte

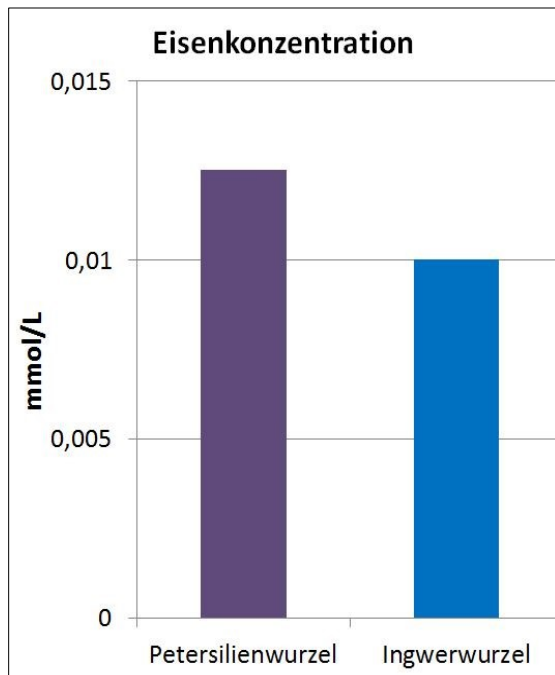


Abbildung 13: Eisenkonzentration der Extrakte

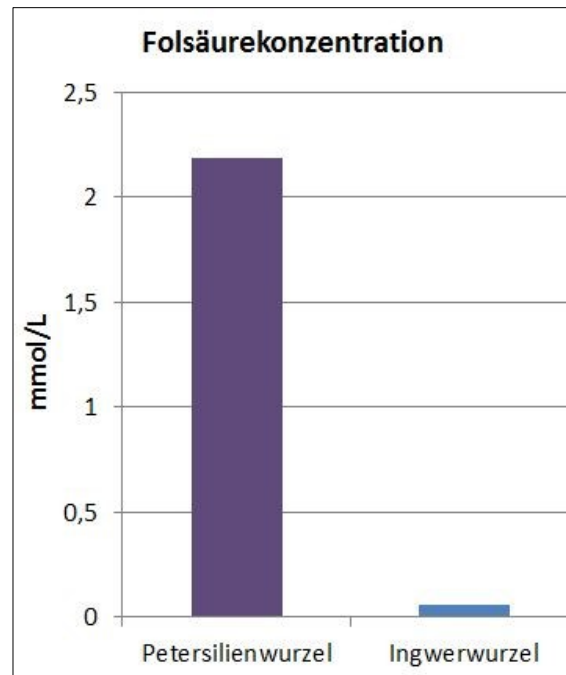


Abbildung 14: Folsäurekonzentration der Extrakte

Selbstverständlich ist in dieser Arbeit der Anteil der Folsäure in der Wurzelpetersilie von besonderer Bedeutung. Mit 2,19 mmol/l zu 0,054 mmol/l übersteigt die Folsäurekonzentration des Petersilienwurzelextrakts die des Ingwerextraktes um das 40-fache.

3.2 Pyrolyse-Feldionisations-Massenspektrometrie (Py-FIMS)

Ziel der massenspektrometrischen Untersuchung der Wurzeln ist die Aufschlüsselung der Hauptbestandteile, um eine Vergleichbarkeit mit den Angaben aus der Literatur zu gewährleisten. Durchgeführt und ausgewertet wurden die Versuche im Institut für Bodenkunde der Universität Rostock. Die vollständige Auswertung aller Peaks ist ein sehr aufwendiges Verfahren, sodass die Zuweisung nur zu eindeutigen Peaks erfolgte. Folglich kann eine Vollständigkeit der Ergebnisse nicht gewährleistet werden.

Die Massenspektren entstammen aus 0,3 mg der geschälten Wurzel-Proben, wozu diese zunächst einer kontinuierlichen Pyrolyse von 50 °C auf 650 °C zugeführt wurden.

3.2.1 Petersilienwurzel

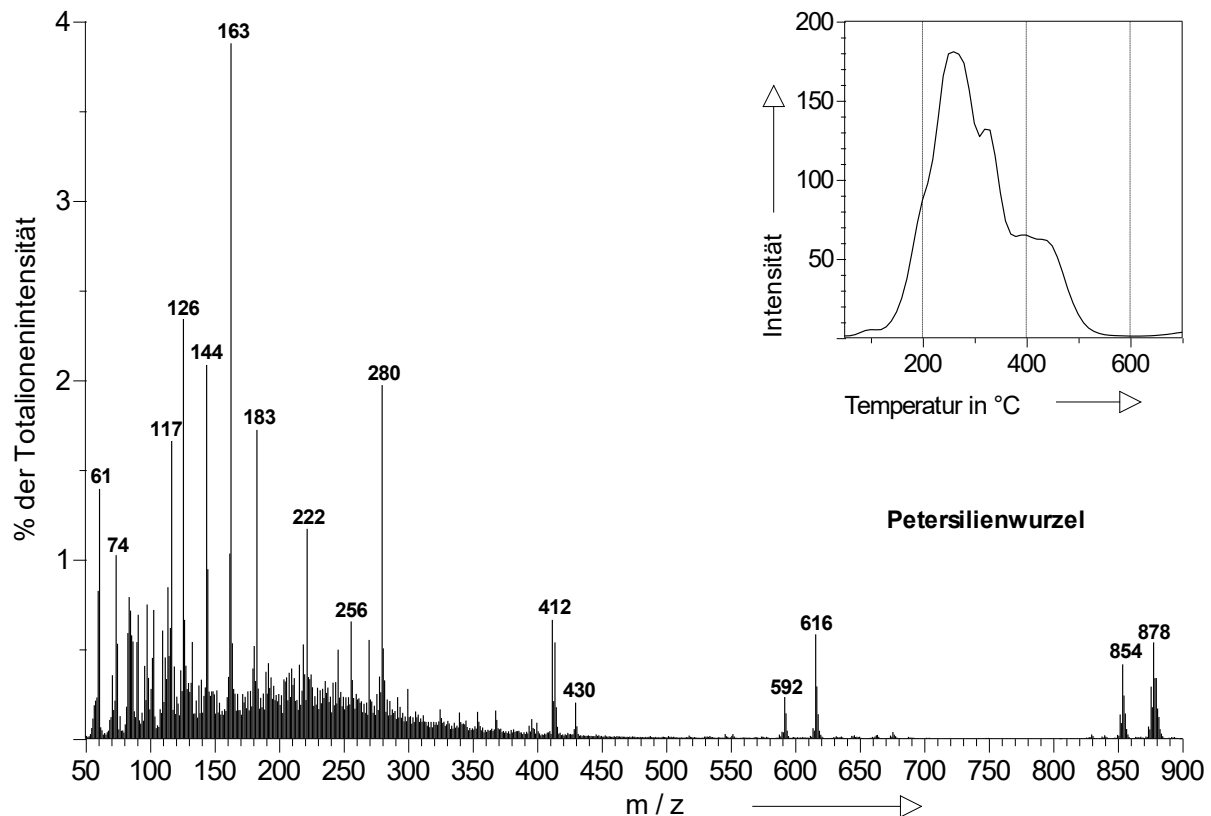


Abbildung 15: Massenspektrum einer Probe aus Petersilienwurzel mit zugehörigem Thermogramm

Zur Auswertung werden unter anderem die Dokumentationen von Poynter et al. (100) ebenso wie von Plazonić et al. (101) herangezogen, die mit einer gekoppelten Gas-Chromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) insbesondere die ätherischen Öle der Petersilie untersuchten. Durch die vorgeschaltete Gas-Chromatographie konnten Sie die Auflösung zur Detektion der Substanzen enorm erhöhen.

Die Abbildung 15 zeigt die Aufsummierung aus 91 Einzelscans. Das Thermogramm zeigt eine relativ gleichmäßige Freisetzung der Substanzen aus der Petersilienwurzel.

Viele der Peaks mit hohem Masse/Ladungs-Verhältnis (m/z = 878, 854, 616, 592, 280) können den Di- bzw. Triglyceriden und deren Bruchteilen zugeordnet werden. Dabei handelt es sich beispielsweise um langkettige Linol- und Palmitinsäuren, die den Großteil der Öle in der Petersilie bilden.

Die Peaks bei m/z = 412, sowie 430 kennzeichnen Sterole; letzteres ist vermutlich das Antioxidans α -Tocopherol (Vitamin E).

Die folgenden Stoffe konnten der Gruppe der Coumarine zugeordnet werden: Isopimpinellin (m/z = 246) sowie Bergapten (m/z = 216).

Auch ein geringer Anteil von Myristicin wurde bei einem Masse/Ladungs-Verhältnis von 192 aufgefunden. Es gehört zu der Gruppe der Phenylpropanderivate, zu denen auch das Apiol zählt. Apiol selber wurde allerdings nicht eindeutig ausfindig gemacht.

Die Markerpeaks mit geringen Masse/Ladungs-Verhältnissen ($m/z=163, 144, 126, 90, 61$) sind mehrheitlich den Zuckern (Hexosen wie beispielsweise Zellulose) und deren Bruchstücken zuzuordnen.

Eine genauere Zuordnung ist vor allem aufgrund von fehlender Literatur zu diesem Thema leider nicht möglich.

3.2.2 Ingwerwurzel

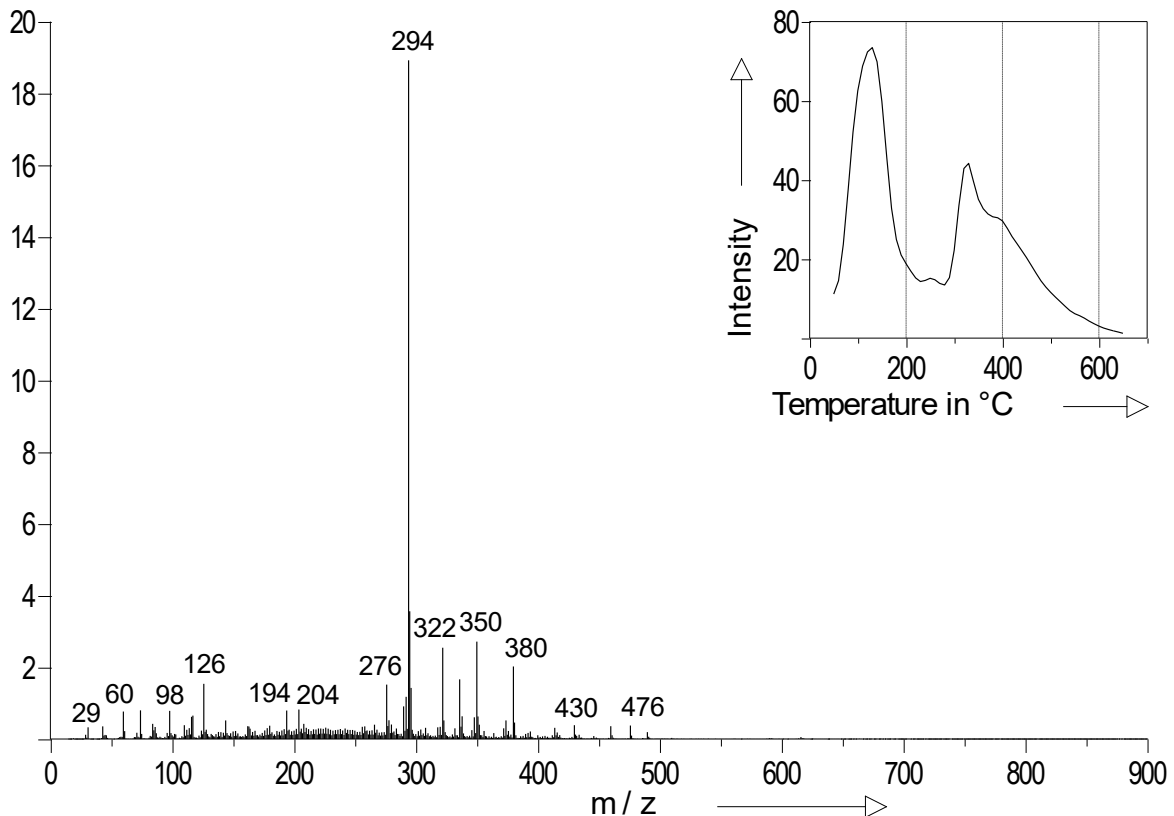


Abbildung 16: Massenspektrum einer Probe aus Ingwerwurzel mit zugehörigem Thermogramm

Aus dem Spektrogramm sticht besonders eine Linie hervor: Der bei $m/z = 294$ gemessene Wert kann den Ölharzen der Gingerol-Gruppe mit der Summenformel $C_{17}H_{26}O_4$ zugeordnet werden.

Im Gegensatz zur Petersilie finden sich zur Auswertung des Massenspektrums von Ingwer ausreichend Literaturstellen. Vor allem die Peaks um die Oleoresine ($m/z =$ um 294), wie Gingerole und Shogaole, sind ausführlich aufgeführt. Verhältnismäßig gering fällt in diesem Versuch der Anteil der Zingiberene (α -Phellandrene und α -Zingiberen) aus, der sich bei $m/z = 134, 204$ befindet. Am Ingweröl hat es der Literatur nach einen Anteil von bis zu 30%. Diese Stoffgruppe ist jedoch äußerst flüchtig, weshalb es womöglich zum Großteil bereits im Vorvakuum verloren ging und ihr Anteil im Spektrogramm derart gering erscheint.

Wie bei der Petersilie, so finden sich auch beim Ingwer geringe Mengen an α -Tocopherol ($m/z = 412, 430$).

Das Thermogramm zeigt einem zweigipfligen Verlauf: Im Temperaturbereich unter 250 °C sind zunächst die flüchtigen Substanzen der Gingerol- und Zingiberon-Gruppen pyrolysiert worden. Ab 300 Grad Celsius wird das Spektrum von Zuckersignalen dominiert. Insbesondere Hexosemarker werden detektiert, vermutlich von Cellulose: $m/z = 126, 144, 163, 98, 60$.

3.3 Trophoblastisolierung und Lichtmikroskopie

Die Anzahl an isolierten Zellen war erwartungsgemäß stark vom Plazentamaterial abhängig. Während die reifen Termplazenten trotz der belastenden Percoll-Zentrifugation durchweg über 50 ml Zellsuspension mit ca. 50-70 Mio. Zellen förderten, fiel die Ausbeute bei Abruptiomaterial mit 13-25 Mio. Trophoblastzellen in 10-15ml Zellsuspension erwartungsgemäß deutlich geringer aus.

Nach der Isolierung kam die Lichtmikroskopie nicht nur zur Zellzählung, sondern auch zur Qualitätskontrolle zum Einsatz. Generell lassen sich die isolierten Trophoblastzellen von Zellschrott und unerwünschten Zellarten (meist übergebliebene Leukozyten und Fibroblasten) durch ihre charakteristische Zellform sicher abgrenzen. Frisch isolierte Trophoblasten erscheinen unter dem Mikroskop als homogen verteilte, einzeln liegende, kugelfunde Zellen. Der Durchmesser dieser Zellen liegt dabei weitgehend einheitliche bei ca. 10 μm (71). Nach Zugabe von Trypanblau bildet sich ein bläulicher Hof um die Zellen. Ins Zytoplasma lebender Zellen dringt der Farbstoff hingegen nicht ein. Routinemäßig wurden am Anfang jedes Tages die Zellkulturen durch das Lichtmikroskop begutachtet. Hieraus ergaben sich bereits grundlegende Erkenntnisse über den Zustand der Kultur. In Abständen von 0, 24, 48, 72, 96 und 144 Stunden wurden Fotodokumentationen erstellt, die die Bildung der mehrkernigen Synzytiotrophoblasten aus einzelnen Trophoblasten aufzeigen (s. Abbildung 18 – Abbildung 23).



Abbildung 17: Percollgradient nach Zentrifugation.

Zeitlicher Verlauf:

Zur Stunde 0, d.h., direkt nach der Aussaat der gerade hergestellten Zellsuspension, schweben die kugelförmigen Trophoblasten gleichmäßig verteilt im Medium.

Nach 24 Stunden sind die Zellen auf den Boden gesunken und der Beginn einer Aggregation lässt sich bereits erahnen. 48 Stunden nach der Isolierung finden sich auf der Bodenplatte zusammengeballte Zellhaufen, in denen erste Verschmelzungen der Zellgrenzen sichtbar werden. Je nach Plazenta

unterschied sich die Anzahl der in einem Haufen aggregierten Zellen: Manche Trophoblastisolate schienen frühere und größere Zellaggregate zu formen als andere. Nach 72h relativierte sich das Bild, sodass spätestens jetzt in allen Kulturen Zellaggregate gefunden wurden, die deutliche Charakteristika der Synzytiotrophoblasten aufwiesen: Große, mehrkernige Synzytien, die meist granulierte Zytoplasmaanteile erkennen lassen. Abgesehen von der Größe änderte sich die übrige Erscheinungsform der Synzytiotrophoblasten von jetzt an kaum noch. Durch anhaltende Zellverschmelzungsprozesse erscheinen die Zellen nach 96h nochmals etwas voluminöser. Von diesem Zeitpunkt an bis zur letzten Betrachtung nach 144h waren keine weiteren Veränderungen erkennbar.

Alle Dokumentationen wurden mit 320-facher (Objektiv: 32x, Okular: 10x) Vergrößerung aufgenommen.

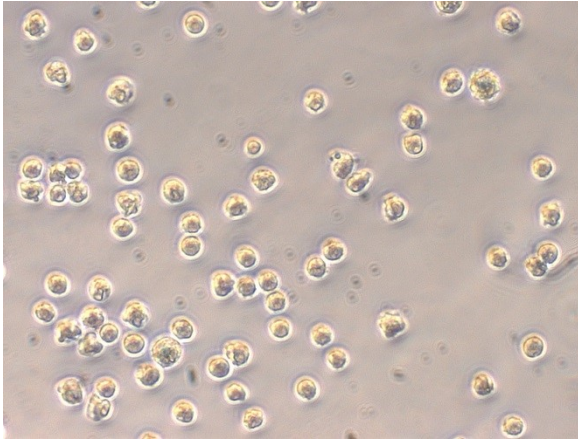


Abbildung 18: 0h frisch isolierte Trophoblasten

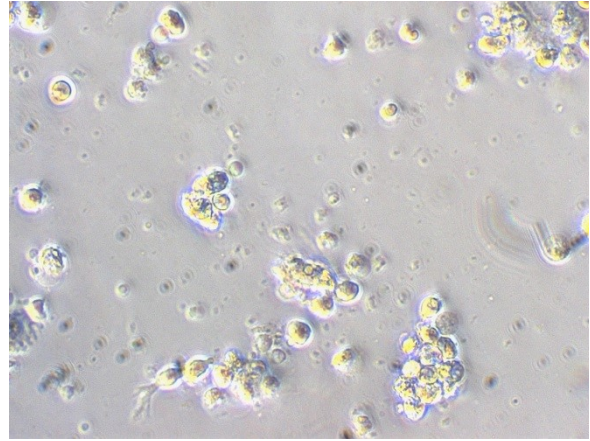


Abbildung 19: 24h Zellaggregation

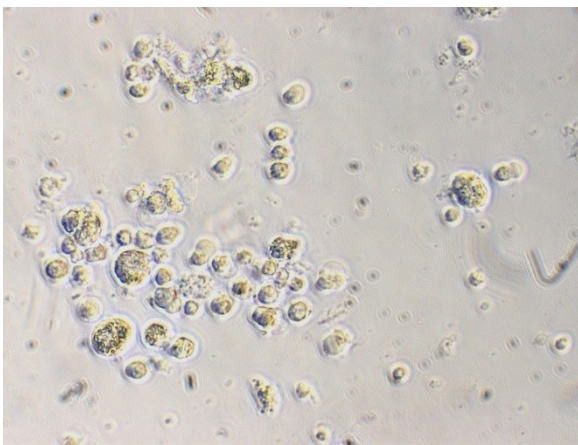


Abbildung 20: 48h Synzytiumbildung



Abbildung 21: 72h Synzytiotrophoblast

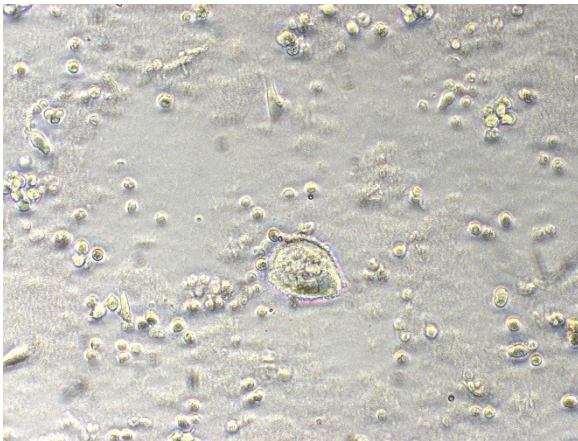


Abbildung 22: 96h Größenzunahme

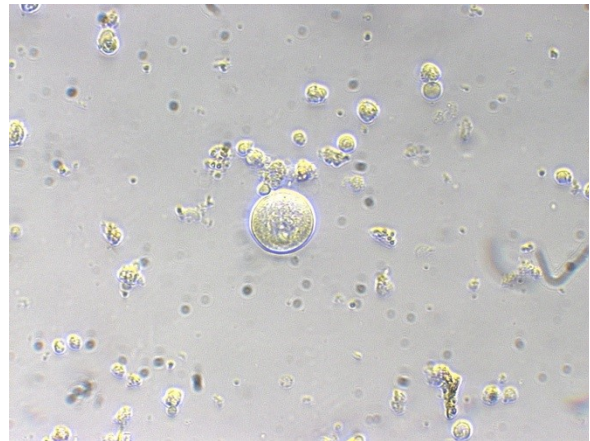


Abbildung 23: 144h Ausgereifter Synzytiotrophoblast

Substanzabhängigkeit:

Im Vergleich zur Kontrollkultur (Medium + Zellen) ist lichtmikroskopisch weder nach Zugabe von Ingwer- noch nach Petersilienwurzelextrakt eine Änderung der Zellformen oder des Aggregationsverhaltens auszumachen.

3.4 Immunhistochemie

Der Nachweis sowie die Charakterisierung der Trophoblastzellen wurden auf immunhistochemischer Grundlage erbracht. Zunächst fixierte der Primärantikörper am Markerprotein Cytokeratin-7, woraufhin das Substrat LinRed durch das an den Sekundärantikörper gekoppelte Peroxidase-Enzym in einen rot-braunen Farbstoff umgesetzt wurde.

Die Hormonsynthese von Estrogenen spiegelt wesentliche Aspekte der Synzytiotrophoblastenfunktion wider. Mit gleicher Methodik wurde deshalb auch nach dem β 1-Estrogenrezeptor gefahndet.

Abbildung 24 und Abbildung 25 zeigen CK-7 markierte Synzytiotrophoblasten, die deutlich erkennbar die rot-bräunliche Nachweisreaktion aufzeigen. Das granulierte Zellplasma sowie die „Schweif“-Form sind Charakteristika der Synzytiotrophoblasten.

Im Vergleich zum CK-7 gelang der Nachweis des Estrogenrezeptors nicht in gleicher Deutlichkeit. Dennoch sind in Abbildung 26 Stellen zu finden, an denen die Farbreaktion stattgefunden hat. Im Gegensatz zum CK-7 scheint die Expression des β 1-Estrogenrezeptor nur bestimmten Zellkompartimenten vorbehalten zu sein.

Die Negativkontrolle in Abbildung 27 illustriert, dass die Färbungsreaktion durch die korrekte Bindung des Primärantikörpers an das ausgewählte Antigen hervorgerufen wurde. Die Kontrolle wurde nur mit dem Sekundärantikörper behandelt und zeigt folglich keine charakteristischen Farbreaktionen, sodass bei dem Versuch insgesamt eine spezifische Nachweisreaktion angenommen werden kann.

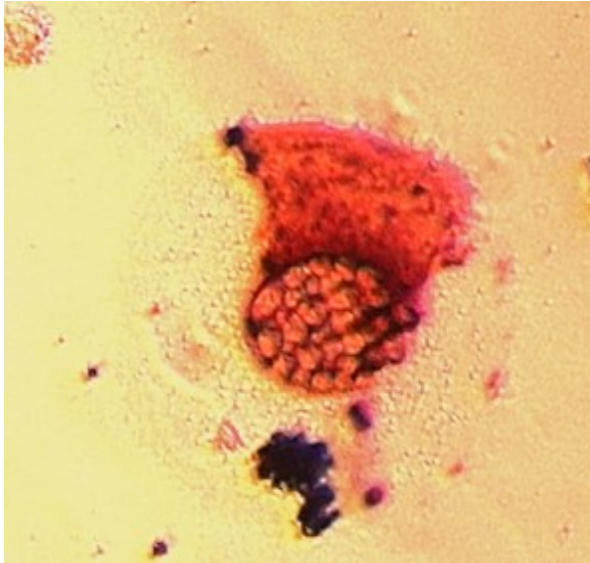


Abbildung 24: CK7-Nachweis Syncytiotrophoblast mit „Schweif“

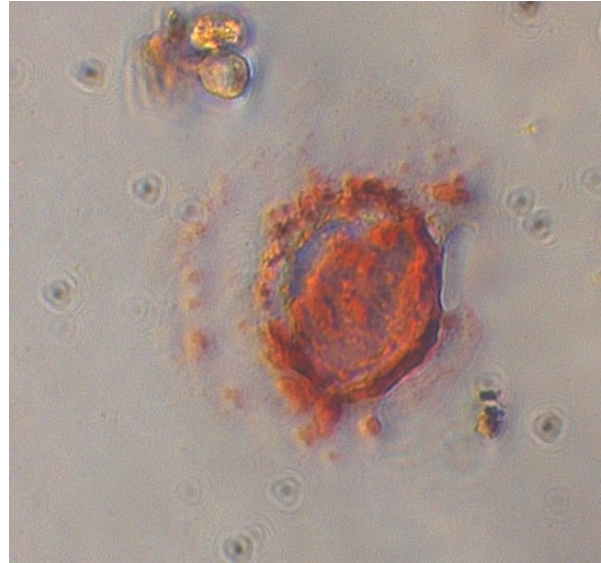


Abbildung 25: CK7-Nachweis granulierter Syncytiotrophoblast

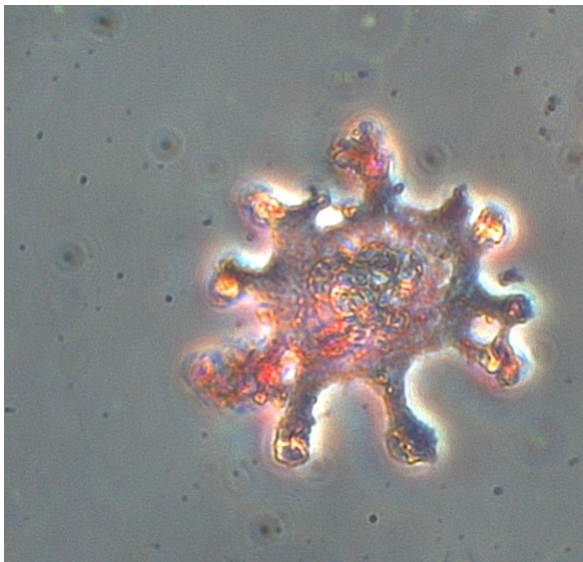


Abbildung 26: Nachweis des beta-1-Estrogenrezeptors

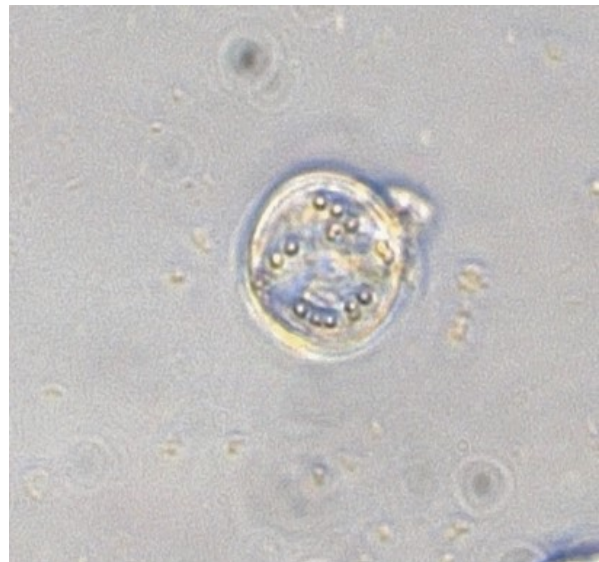


Abbildung 27: Negativkontrolle

Zunächst soll in den folgenden Abschnitten der grundlegende Zellmetabolismus Betrachtung finden. Dazu gehören die Messung der Glucosekonzentration sowie die Änderungen des pH-Wertes im Medium.

3.5 Glucosekonzentration

Photometrisch wurde mit der Glucose-Dehydrogenase-Methode die Glucosekonzentration im Überstand bestimmt. Die Messungen wurden an fünf Term- sowie fünf Abruptionplazenten nach

jeweils 24h und 144h vorgenommen. Übersichtshalber werden die Messwerte der Term- und Abruptioplazenten zunächst nur unter sich betrachtet. Dafür werden die Messdaten gleicher Extraktkonzentration nach 24h und 144h in einer Grafik gegenübergestellt.

Die Probedaten, die nach 24h ermittelt wurden, sind bereits bei der Zellkulturanlage (also zur Stunde 0) mit den Saftextrakten beimpft worden, während bei der Messung nach 144h zunächst 72h lang eine Synzytiumbildung abgewartet wurde und erst dann die Extraktzugabe erfolgte. Somit ist zu beachten, dass diese Gegenüberstellung (24h-144h) nicht direkt vergleichbar ist.

Abbildung 28 und Abbildung 30 geben einen Überblick der ermittelten Werte, während die jeweils folgende Abbildung 29 und Abbildung 31 illustriert, wie sich die Glucosekonzentration durch den Zellmetabolismus bei Term- bzw. Abruptioplazenten im zeitlichen Verlauf ändert. Dazu wird die Differenz des Messwertes zum Ausgangswert (Glucosekonzentration des Mediums) berechnet. Um diese Konzentrationsveränderungen besser einschätzen zu können, zeigen die Darstellungen die Änderungen in Prozentpunkten auf. Alle Werte sind mit der jeweils dazugehörigen Standardabweichung angegeben.

Übersicht über die gemessene Glucosekonzentration bei in-vitro-Studien mit Trophoblastzellen aus Termplazenten:

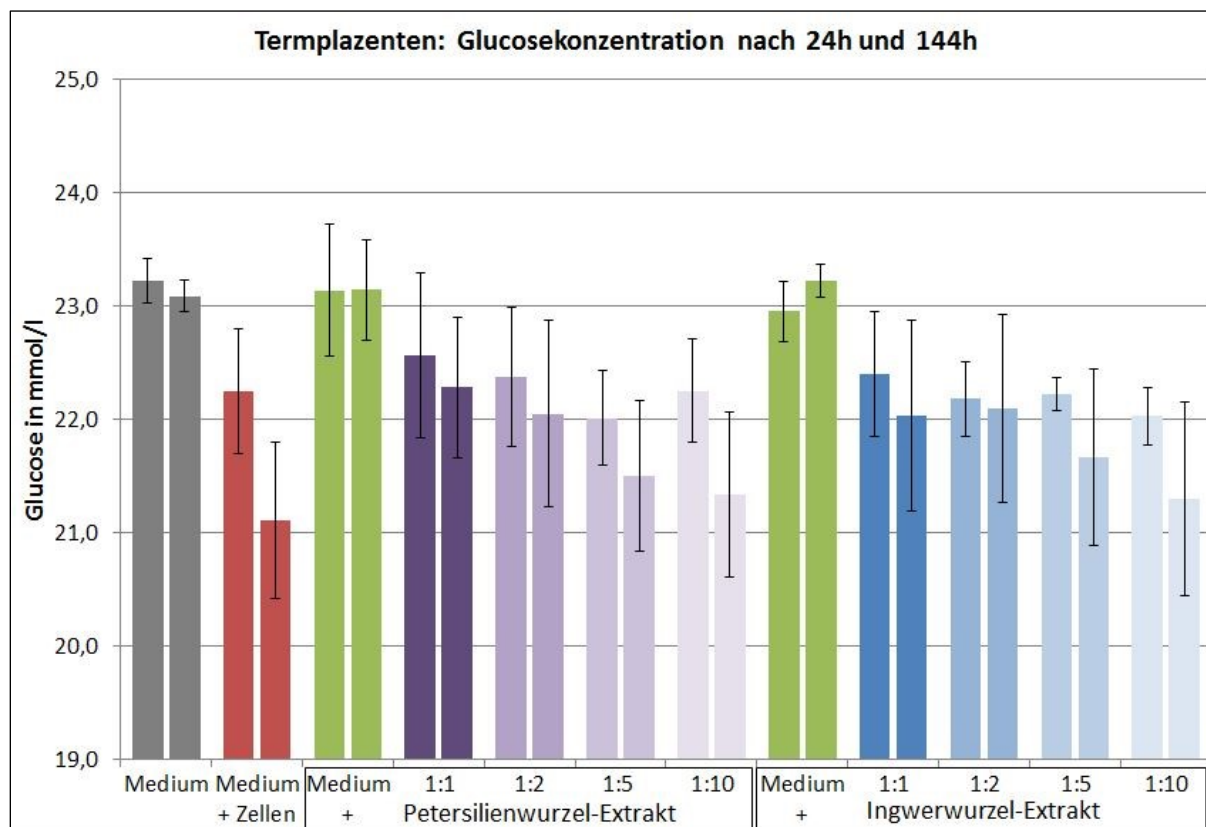


Abbildung 28: Termplazenten - Absolute Glucosekonzentration im Mediumüberstand nach 24h (linker Balken) und 144h (rechter Balken - davon 72h unter Extraktbeimpfung). Gemittelte Absolutwerte von 5 Termplazenten mit Standardabweichung.

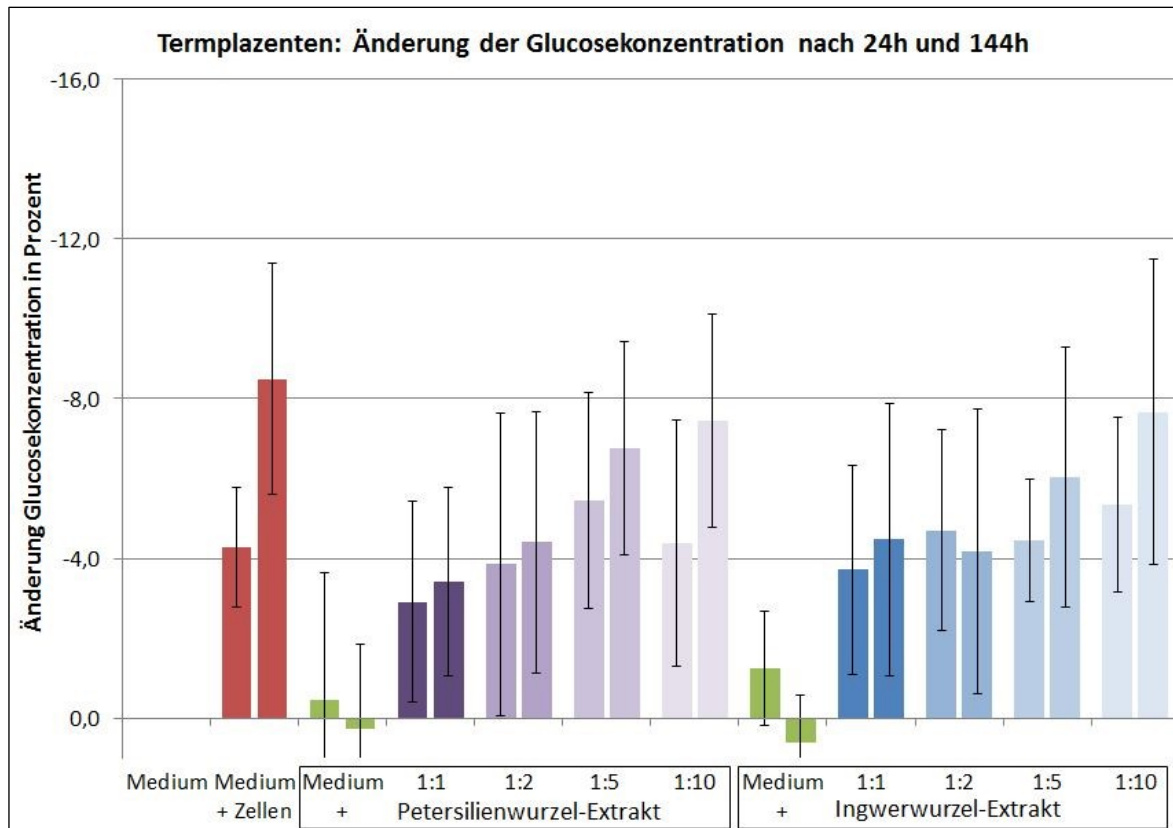


Abbildung 29: Termplazenten - Änderung der Glucosekonzentration im Vergleich zur Nullprobe (Medium) nach 24h (linker Balken) und 144h (rechter Balken - davon 72h unter Extraktbeimpfung). Relative Änderung zur Glucosekonzentration im Medium (Glucosekonz. im Medium \pm 100%), gemittelt aus 5 Termplazenten mit Standardabweichung.

Übersicht über die gemessene Glucosekonzentration bei in-vitro-Studien mit Trophoblastzellen aus Abruptioplazenten:

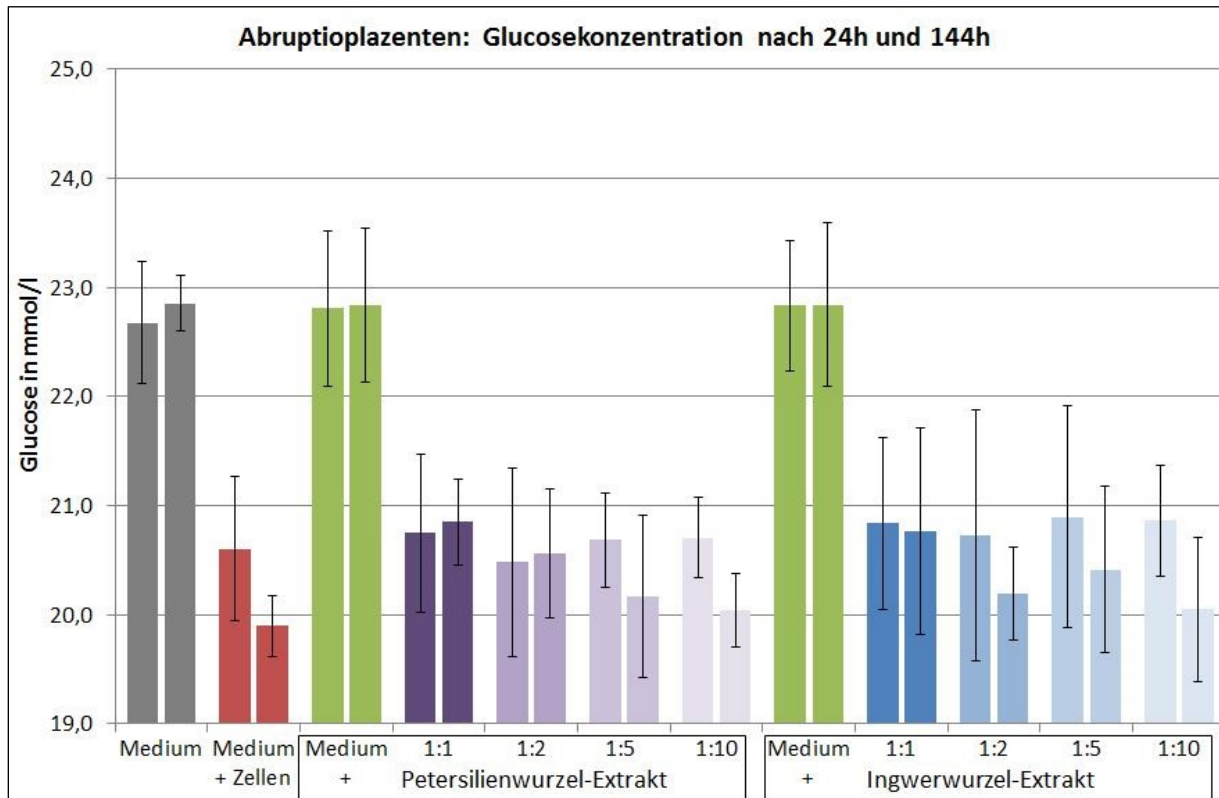


Abbildung 30: Abruptioplazenten - Absolute Glucosekonzentration im Mediumüberstand nach 24h (linker Balken) und 144h (rechter Balken - davon 72h unter Extraktbeimpfung). Gemittelte Absolutwerte von 5 Abruptioplazenten mit Standardabweichung.

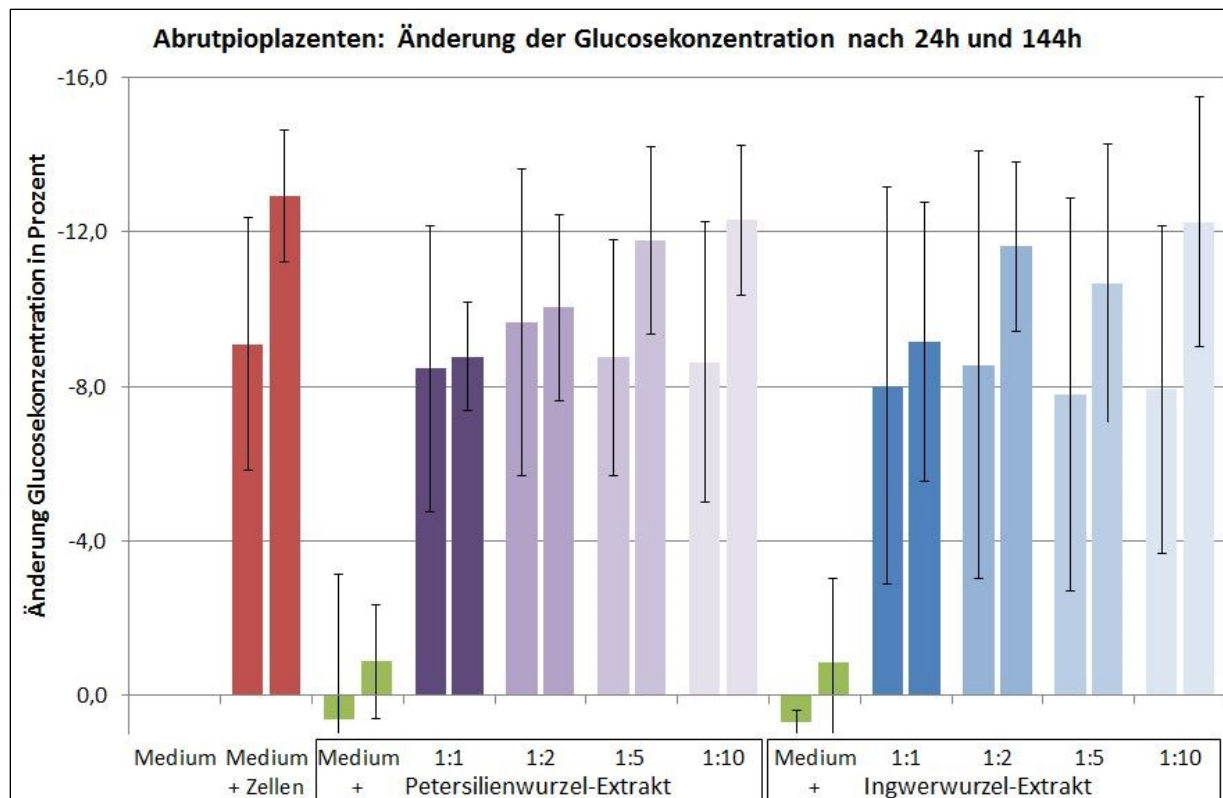


Abbildung 31: Abruptioplazanten - Änderung der Glucosekonzentration im Vergleich zur Nullprobe (Medium) nach 24h (linker Balken) und 144h (rechter Balken - davon 72h unter Extraktbeimpfung). Relative Änderung zur Glucosekonzentration im Medium (Glucosekonz. im Medium \pm 100%), gemittelt aus 5 Abruptioplazanten mit Standardabweichung.

Im Medium (grau) wird eine Glucosekonzentration im Mittel von ca. 23,0 mmol/l (Einzelwerte: 22,4-23,6 mmol/l) gemessen. Dieser konstant gemessene Wert verblüfft, da der Hersteller des Mediums einen Glucosegehalt von 4,5 g Glucose pro Liter angibt, was umgerechnet auf SI-Einheiten 25 mmol/l entsprechen würde.

Substanzkontrolle:

Die Pflanzensaftextrakte enthalten von Natur aus Glucose. Eine Substanzkontrolle (Medium + Extrakt (1:1)) soll Aufschluss darüber geben, ob die Zugabe des Saftes schon zu einer bedeutenden Konzentrationsänderung führen kann. Die alleinige Substanzzugabe (grün) zum Medium führt jedoch weder durch PWS- noch durch Ingwerextrakt zu einer signifikanten Veränderung der Glucosekonzentration.

Die gemittelten Messwerte der Proben, die Zellsuspension enthalten (Med + Zellen; Med + Zellen + Extrakte), weisen im Vergleich zu den zellfreien Versuchsproben (Med; Med + Extrakte) deutlich geringere Glucosekonzentrationen auf. So ist beispielsweise nach 24h die Glucosekonzentration der Kontrollprobe (Med + Zelle) der Zellkulturen aus Abruptioplazanten im Mittel um 9 Prozentpunkte (SD \pm 3,3%) geringer als die des Mediums. Nach 144h sind bereits 13% (SD \pm 1,7%) der Glucose-Lösung verbraucht.

Zeitlicher Verlauf:

Der Vergleich zur Messung nach 144h offenbart, dass beide Zellreihen (aus Term- wie auch Abruptiomaterial) in den ersten 24h einen überproportional größeren Anteil der Glucoselösung verstoffwechseln als in den darauffolgenden 120 Stunden.

Möglicherweise zehren die Isolierungs- und Aufbereitungsmaßnahmen an den Energiereserven der Trophoblastzellen, die nach der Aussaat mit der Glucoselösung wieder aufgefüllt werden müssen.

Im Vergleich zu den Termproben zeigen die gemittelten Messungen der Abruptiomaterialproben durchweg einen größeren Abfall der Glucosekonzentration auf. Allerdings liegen hier die Einzelmesswerte auch weiter auseinander, was in einer großen Standardabweichung resultiert.

Extraktabhängigkeit:

Nach 24h sind die Trophoblastzellen noch keine Synzytiumbildung eingegangen. Die erste Messung erfasst somit die Beeinträchtigung dieser „jungen“ Trophoblastzellen durch die Saftextrakte. Die Messungen nach 24h lassen keine konzentrationsabhängige Wirkung der Extrakte auf die Glucoseaufnahme erkennen.

Die nach 72h hinzugegebenen Extrakte wirken auf die durch Zellverschmelzung hervorgegangenen Synzytiotrophoblasten ein. Zumindest bei hoch dosierter Extraktzugabe zeigen sich nach 144h Wirkungen auf die Glucosekonzentration im Überstand. Die gemittelten Werte legen die Vermutung nahe, dass beide Pflanzenextrakte einen negativen, konzentrationsabhängigen Einfluss auf die Glucoseaufnahme haben. Einen signifikanten Unterschied zur Kontrolle weisen jedoch nur die Proben auf, die mit der höchsten PWS-Konzentration (PWS 1:1) behandelt wurden (Term: $p = 0,04$; Abruptio: $p = 0,002$), obgleich der unverdünnte Ingwerextrakt das Signifikanzniveau ($p < 0,05$) mit einem Wert von Term: $p = 0,08$ und Abruptio: $p = 0,09$ auch nur knapp verfehlt.

3.6 pH-Messung

Aus dem Zellmetabolismus hervorgegangene Abbauprodukte (z.B. Pyruvat, Lactat...) können ebenso Einfluss auf den pH-Wert des Mediums haben wie das durch Zellatmung freigesetzte CO_2 . Mittels kalibrierten pH-Meter soll untersucht werden, ob der Probenüberstand Verschiebungen ins Saure oder Basische aufweist. Die Messungen wurden nach 24h und 144h an allen Proben aus Term- und Abruptiomaterial durchgeführt. Abbildung 32 und Abbildung 33 zeigen die gemittelten Messergebnisse für Term- und Abruptiokulturen auf, wobei der Wert nach 24h dem nach 144h gegenübergestellt wird.

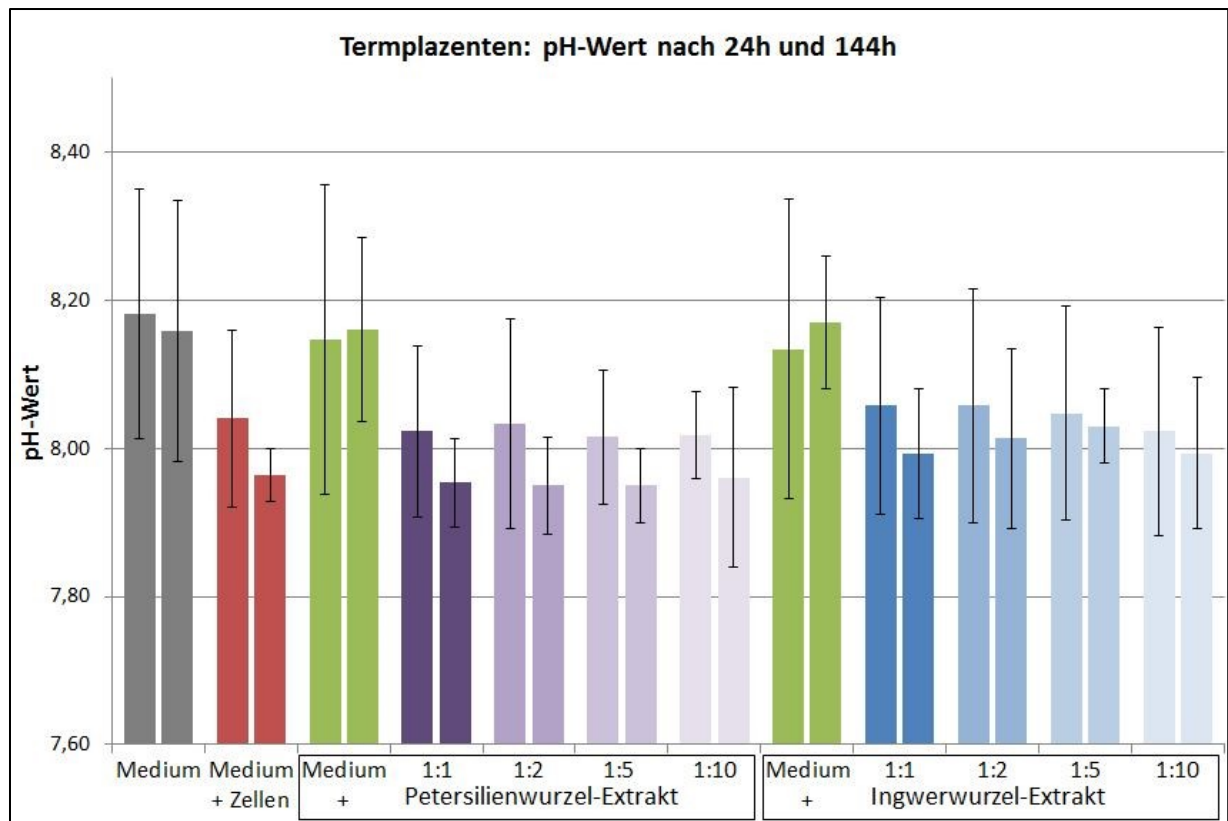


Abbildung 32: Gemittelte pH-Werte aus 5 Termplazenten nach 24h (linker Balken) und 144h (rechter Balken - davon 72h unter Extraktbeimpfung)

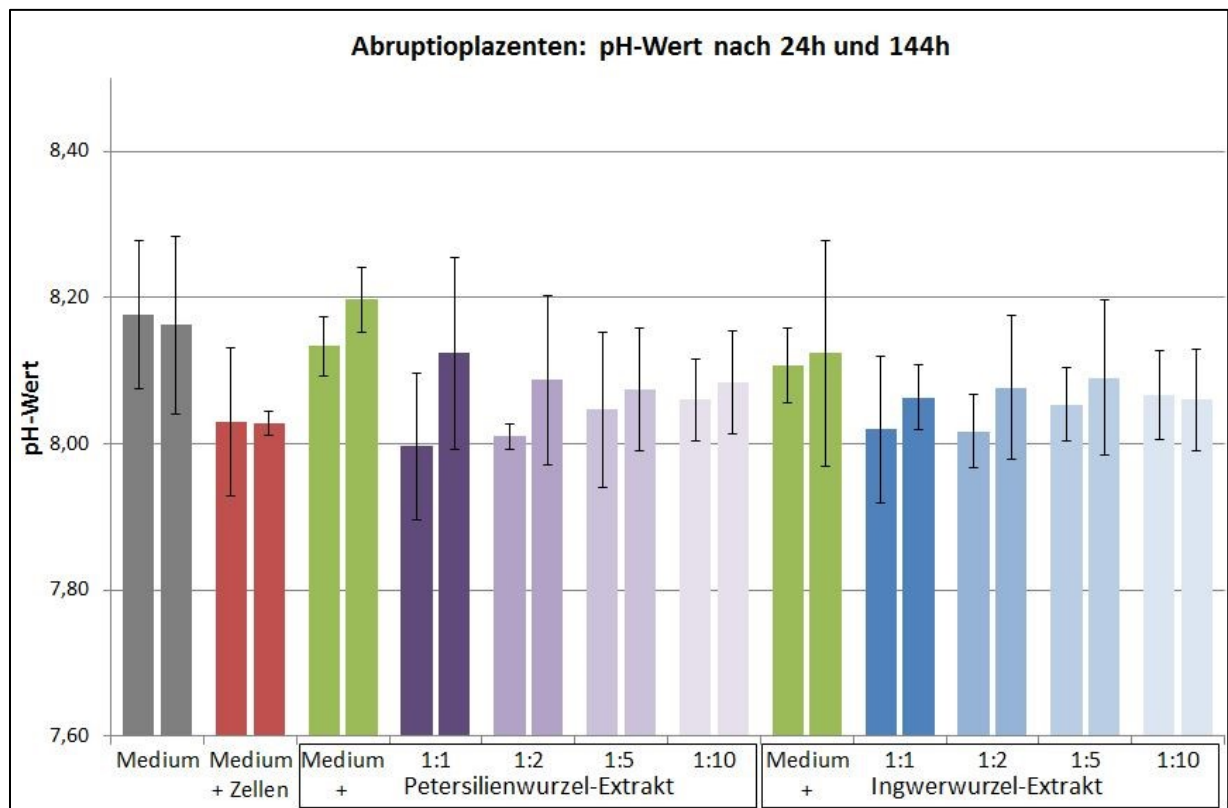


Abbildung 33: Gemittelte pH-Werte aus 5 Abruptioplazenten nach 24h (linker Balken) und 144h (rechter Balken - davon 72h unter Extraktbeimpfung)

Im Medium werden gemittelte pH-Werte zwischen 8,16 (Termn-) und 8,18 (Abruptioplazenten) gemessen (Einzelmessungen: 8,07-8,30). Zu beachten ist der Einfluss der Inkubation unter Brutschrankbedingungen, da dort der CO₂-Anteil konstant bei 5% gehalten wird.

Substanzkontrolle:

Purer PWS hat einen pH-Wert von 6,60. Der Ingwer-Extrakt weist einen pH 6,09 auf. Die Substanzkontrollen aus Medium und Extrakt (1:1) zeigen keine maßgebliche Verschiebung des Säure-Base-Verhältnis durch die Saftextrakte.

Wie bei der Glucosemessung weisen auch bei der pH-Bestimmung die gemittelten Messdaten der Zellsuspension enthaltenden Proben (Med + Zellen; Med + Zellen + Extrakte) im Vergleich zu den zellfreien Versuchsproben (Med; Med + Extrakte) etwas geringere Werte auf. Signifikante Unterschiede lassen sich hier jedoch nicht beschreiben. Wie oben bereits erwähnt, könnten ins Medium freigesetzte saure Zellmetabolite ursächlich für diese Abnahme des pH-Wertes sein.

Zeitlicher Verlauf:

Bereits nach 24h liegen die gemittelten pH-Werte der Kontrollen (Medium und Zellen) merklich unter denen des Mediums. Da die Daten der Bestimmung nach 144h kaum von denen der ersten Messung abweichen, ist anzunehmen, dass sich das pH-Milieu frühzeitig (innerhalb der ersten 24h) ausbildet und dann relativ stabil auf diesen Niveau hält.

Extraktabhängigkeit:

Die Ergebnisse liefern keinen Beleg für eine extraktabhängige Beeinflussung des pH-Wertes.

Für eine zielführende statistische Auswertung dieser Versuchsreihe sind die gemittelten Unterschiede der extraktbehandelten Proben zu gering und die Standardabweichung zu groß. Im Mittel weicht kein pH-Messwert mehr als 3% von der Kontrolle (Medium + Zellen) ab. Trotz Kalibrierung ist die Messmethode nicht genau genug, um diese geringen Unterschiede ausreichend zu differenzieren.

3.7 H₂O₂-Konzentration

Reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygen species, ROS) entstehen spontan oder bei enzymkatalysierten Redoxreaktionen, die unter Umsatz von Sauerstoff ablaufen (102). Besonders unter Minderperfundierung entspringt ein Großteil der Oxidantien aus der mitochondrialen Elektronen-Transport-Kette und ist somit endogenen Ursprungs.

Ebenso vielfältig wie die Genese ist die Wirkung auf die Zellkulturen, die von Membranlipidoxidationen über DNA-Strangabbrüche bis hin zur Modifikation des Zytokinmetabolismus reicht.

Im Plazentagewebe beeinflusst oxidativer Stress die Synzytium- und Gefäßbildung. Mutmaßlich wirkt sich dieser Faktor auch auf die Hormonproduktion (hCG) und schließlich auch auf die Präeklampsierate aus (90).

Die Lebensmittelindustrie hat mit Petersilie aller Voraussicht nach ein vielseitiges und natürliches Antioxidationsmittel gefunden. Diese in-vitro-Studie kann möglicherweise eine grobe Einschätzung über die antioxidative Leistung der Petersilienwurzel unter Zellkulturbedingungen aufzeigen.

Die Anzahl der verschiedenen Oxidantien auf molekularer Ebene ist immens. Viele Reaktanten existieren nur für Sekundenbruchteile, was ihre Detektion enorm erschwert. In diesem Kontext hat sich Wasserstoffperoxid als relativ stabiler Marker für das oxidative Geschehen etabliert.

Mit Hilfe des BioVision® Hydrogen Peroxide-Assay wird H_2O_2 -abhängig das colorimetrisch messbare Substrat umgesetzt. Die mit einer Standardkurve kalkulierte Wasserstoffperoxidkonzentration (H_2O_2) charakterisiert einen wichtigen Parameter im weitläufigen System der Oxidationsprozesse.

Die Messung erfolgte nach 24 und 144 Stunden aus 100 μl Überstand. Die einmalige Messung einer deutlich negativen Stoffkonzentration ($C_{\text{H}_2\text{O}_2} < 0 \text{ pmol/l}$), hat den Ausschluss der gesamten Materialprobe zur Folge. Dies traf auf eine Durchführung mit Abruptiogewebe zu, sodass nur Material aus vier Abruptio- und fünf Term zur Auswertung herangezogen wurden.

Abbildung 34 und Abbildung 35 illustrieren die Messergebnisse nach 24h und 144h für Zellkulturen aus Term- bzw. Abruptioplazenten.

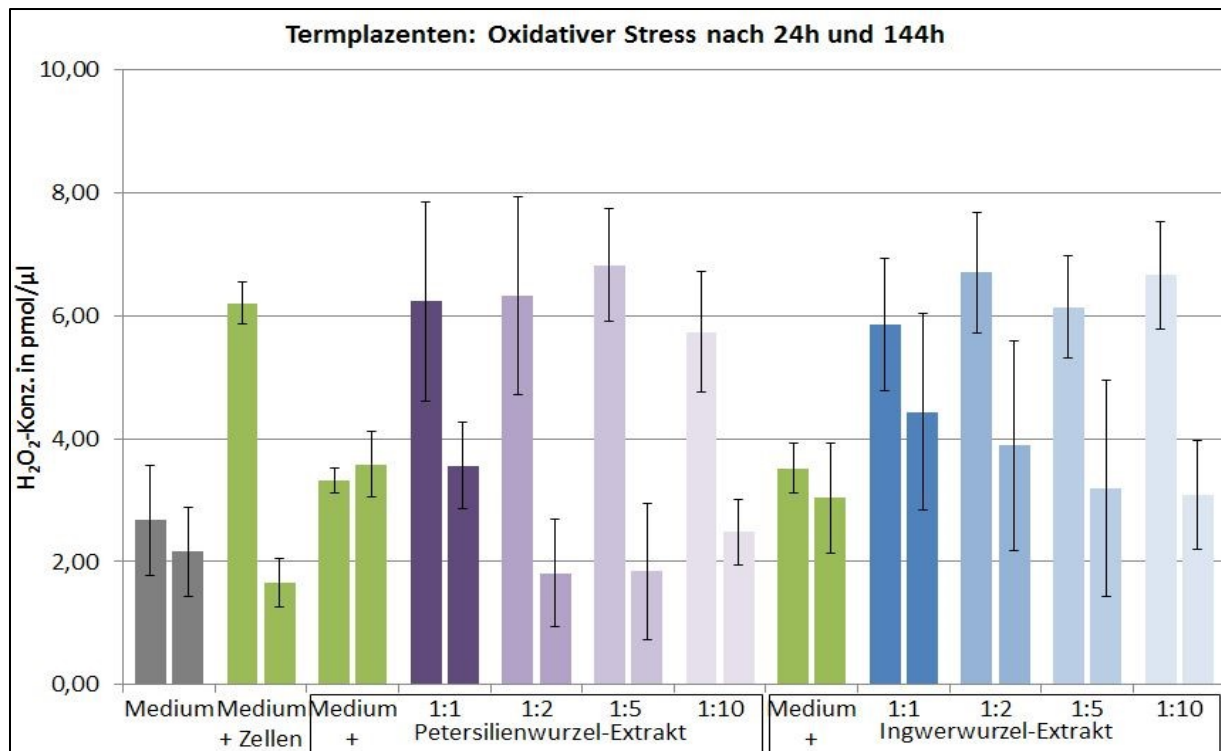


Abbildung 34: Gemittelte H_2O_2 -Konzentration im Mediumüberstand aus 5 Termplazenten nach 24h (linker Balken) und 144h (rechter Balken) mit Standardabweichung

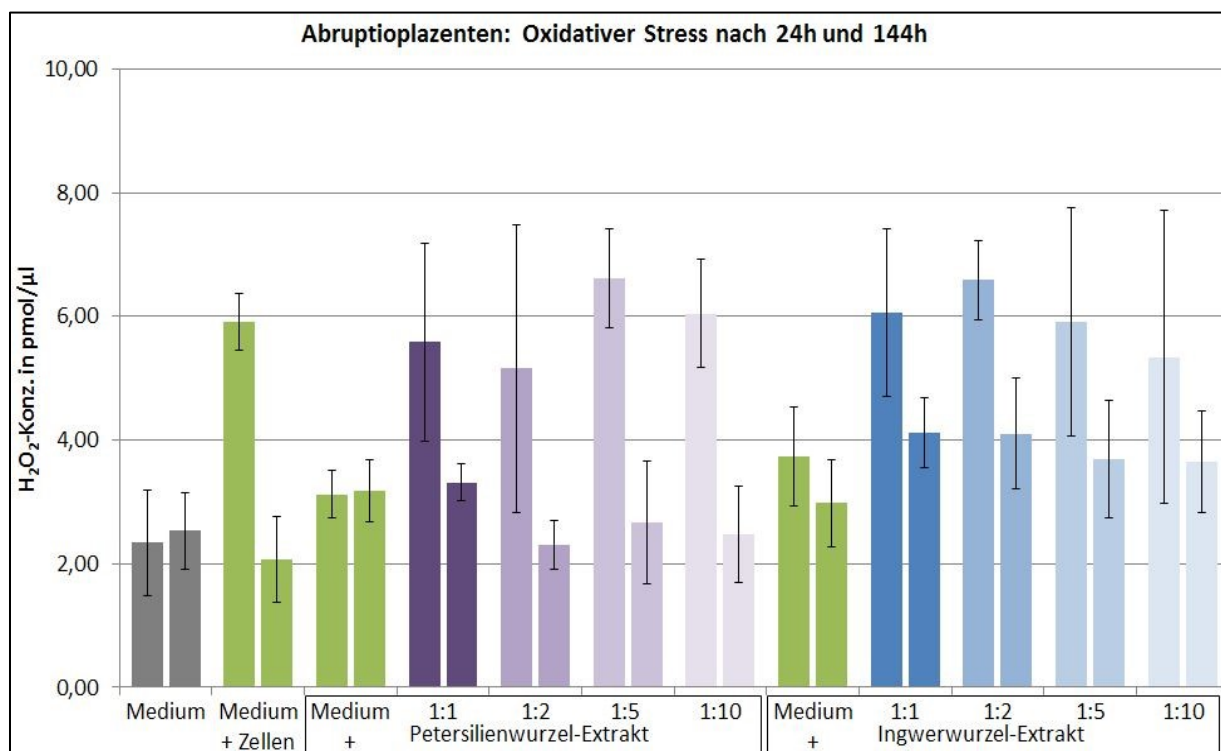


Abbildung 35: Gemittelte H_2O_2 -Konzentration im Mediumüberstand aus 4 Abruptioplazenten nach 24h (linker Balken) und 144h (rechter Balken) mit Standardabweichung

Substanzproben:

Das Medium verfügt über eine gemittelte H_2O_2 -Konzentration von 2,5 pmol/l nach 24h bzw. von 2,3 pmol/l nach 144h. Die Mittelwerte der mit Petersilienwurzel versetzten Substanzproben (Med + PWS) liegen geringfügig darunter, während der Ingwerextrakt zu einem moderaten Ansteigen der H_2O_2 -Konzentrationswerte im Medium führt. Signifikante Veränderungen am Medium werden weder von PWS- noch von Ingwerextrakt hervorgerufen.

Zeitlicher Verlauf:

Im Vergleich zum Medium ist nach 24h in fast allen Zellkulturen (außer Abruptio PWS 1:1 und Ing 1:5) eine signifikant erhöhte H_2O_2 -Konzentration messbar. Zu berücksichtigen sind die breiten Streuungen der 24h-Messwerte, aus denen die vergleichsweise großen Standardabweichungen resultieren. Offenbar geht die Isolierung und Aufbereitung der Trophoblastzellen mit einem deutlichen Anstieg der oxidativen Last einher. Dagegen demonstrieren die gemessenen Werte nach 144 Stunden, dass die Zellen über Möglichkeiten verfügen, um diese oxidative Stresssituation abzubauen. Zwischen den beiden Messungen (24h-144h) sinkt die gemittelte Konzentration des Wasserstoffperoxids in der Kontrolle (Medium + Zellen) um ca. 2 pmol/l was einem Abfall von einem Drittel des Ausgangswertes gleich kommt.

Extraktabhängigkeit:

Die 24h-Messwerte der neu angelegten Trophoblastzellkulturen lassen noch keine Beeinflussung durch die Extrakte vermuten. Nach 144h beschreiben die Balkendiagramme der Petersilienwurzel- wie auch die der Ingwerextraktverdünnungen einen konzentrationsabhängigen Verlauf. Bezogen auf die H_2O_2 -Konzentration der Zellkulturen zeigen die beiden Extrakte gegenläufigen Wirkungen: Während die gemittelten Messwerte der Petersilienverdünnungen durchweg unterhalb der Kontrolle (Med + Zellen) liegen, positionieren sich besonders die hoch konzentrierten Ingwerextraprobe oberhalb der Kontrollprobe. Die gemessenen Konzentrationen in der unverdünnten Petersilien-Probe aus Abruptiomaterial (Abrupt. PWS 1:1) unterscheiden sich signifikant ($p=0,01$) von der Kontrolle (Med + Zellen). Mit abnehmender Extraktkonzentration assimilieren sich alle Probenmittelwerte auf das Niveau der Kontrolle.

Diese Beobachtungen implizieren die Vermutung, dass unter in-vitro-Bedingungen Petersilienwurzel-saft eine konzentrationsabhängige Senkung der H_2O_2 -Konzentration bedingt und folglich ein Rückgang des oxidativen Stresses der Zellkultur anzunehmen ist.

Die gemittelten Daten der Vergleichssubstanz Ingwer liegen zwar größtenteils über denen der Kontrolle, die große Streuung der Einzelwerte verhindert jedoch das Aufstellen einer fundierten Hypothese zur Konzentrationsrelation und Wirkung des Ingwers.

3.8 LDH-Zytotoxizitäts-Test

Beim Untergang von Zellen gelangt das Lactatdehydrogenase-Enzym (LDH) aus dem Zytoplasma hinein ins Medium. Die LDH-Konzentration fungiert in diesem in-vitro-Test als unspezifischer Marker für den durch die Extrakte hervorgerufenen Zellschaden.

Die Messung erfolgt nach 48h, derweil bereits nach 24h ein Mediumwechsel auf 1%-iges FKS-Medium durchgeführt werden muss.

Über gekoppelte Reaktionen ist das LDH-Enzym an der Umsatzreaktion eines Tetrazolium-Salzes beteiligt, dessen rotes Reaktionsprodukt photometrisch quantifiziert wird. Die Bestimmung der Lactatdehydrogenase-Konzentration gelingt nun indirekt aus der LDH-Enzymaktivität, welche proportional zu den gemessenen Extinktionswerten ist.

Triton X-100 löst Zellmembranbestandteile, ohne dabei in Wechselwirkung mit weiteren Prozessen der Zellbiologie zu kommen. Da die Zellkultur in der High-Control (1% Triton X-100) vollkommen lysiert ist, kommt der ermittelte LDH-Wert einem Zytotoxizitätswert von 100% gleich. Abbildung 36 stellt die prozentuale Zytotoxizität der Extraktverdünnungen sowie der Tritonkontrolle dar. Die Low-Control (Med + Zellen) entspricht einem Zytotoxizitätswert von 0%.

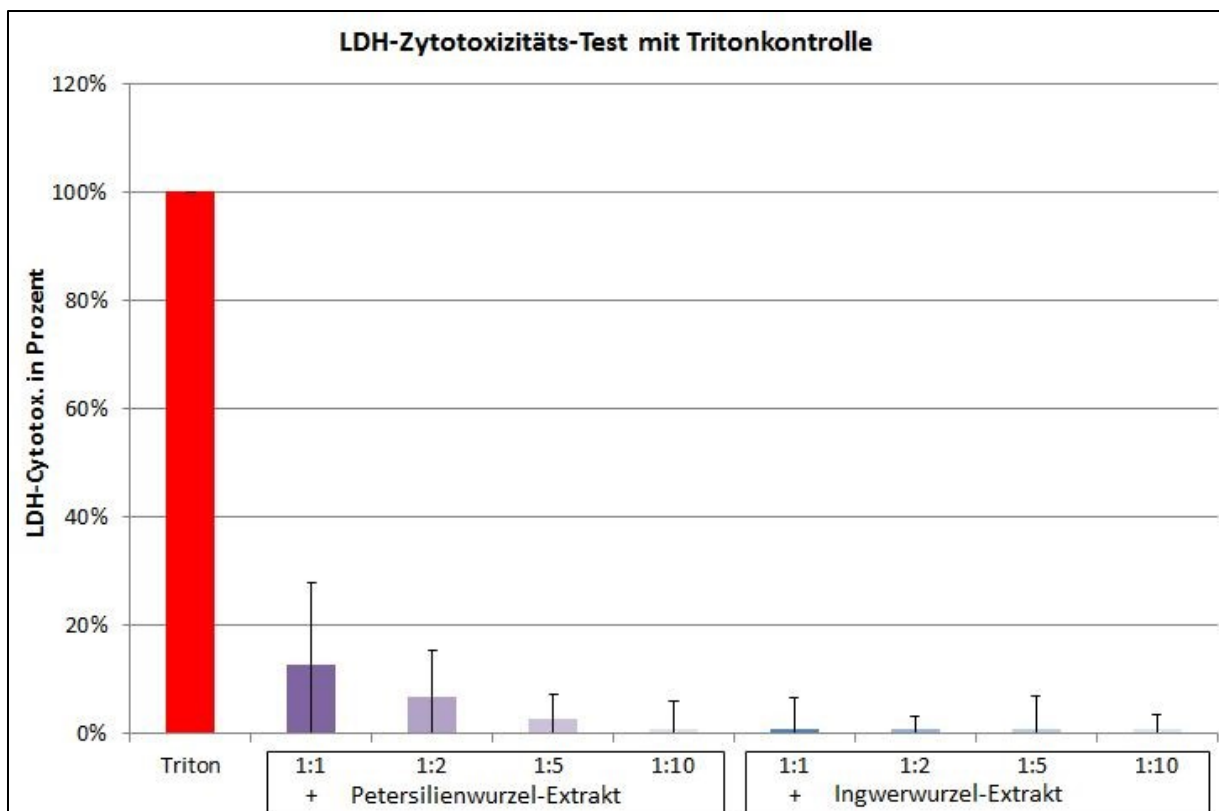


Abbildung 36: Gemittelte LDH-Zytotoxizität aus 5 Termplazentenproben im Vgl. zu Med + Zellen. Werte zwischen 0% bis 1% sind zur besseren Darstellbarkeit auf 1% gerundet

Die oben aufgeführten Zytotoxizitätswerte entstammen aus dem Material von 5 Termplazenten. Abruptioplazenten lieferten durchweg unvereinbare Ergebnisse, die zum vollständigen Ausschluss

der Abruptio-Versuchsreihen führten. Dabei lag der Triton-Wert immer unter dem der Low-Control (Med + Zellen) und meist sogar unter dem des Blindwertes (Medium), was der Logik des Versuchsaufbaus widerspricht. Der Blick durchs Mikroskop offenbarte eine nahezu vollständige Lyse der mit Triton behandelten Zellen, sodass ein Versagen der Tritonfunktion unwahrscheinlich erscheint. Vergleiche hierzu 4.2.2 Methodenkritik.

Substanzkontrolle:

Die Extraktproben wurden bei den ersten zwei Durchläufen mit angesetzt. Zur besseren Übersicht wird auf eine Illustrierung der Werte verzichtet, da beide Substanzproben (Medium + PWS; Medium + Ing) zum Blindwert keine bedeutende Abweichung (<5%) aufzeigen.

Alle auswertbaren Proben zeigen einen signifikant niedrigeren Zytotoxizitäts-Wert als das Zellgift Triton X-100.

Substanzabhängigkeit:

Die Probe, die mit unverdünnten PWS (PWS 1:1) behandelt wurde, erreicht im Mittel mit 13% (SD=15%; Einzelwerte zwischen 0%-26%) den höchsten Zytotoxizitätswert. Mit abnehmendem Konzentrationsanteil nähern sich die Extinktionswerte denen der Kontrolle an.

Trotz der leicht höheren Mittelwerte der PWS-Proben lassen im LDH-Test beiden Wurzelextrakte keine signifikante Erhöhung der LDH-Werte nachweisen. Die mittlere letale Dosis (LD₅₀) wird in den hier getesteten Mischverhältnissen durch unverdünnten PWS bei Weitem nicht erreicht. Auf der vom Fraunhofer-Institut vorgeschlagenen Zytotoxizitätsskala für in-vitro-Zellkulturen (103) erlangen alle gemessenen Zytotoxizitätswerte die Gradeinteilung „0“, welche als „nicht zytotoxisch“ definiert wird. Die Ergebnisse der Vergleichssubstanz sind eindeutig: Alle Extinktionswerte der mit Ingwerextrakt versetzten Proben liegen auf dem Niveau der Low-Control. Im LDH-Test kann Petersilien- sowie Ingwerextrakt auch in hohen Dosen keine Zytotoxizität nachgewiesen werden.

3.9 MTT-Zellviabilitäts-Test

Mit der aktiven Aufnahme und Metabolisierung eines colorimetrisch detektierbaren MTT-Substrats erlaubt der MTT-Test eine Einschätzung der Zellviabilität. Über die Quantifizierung der Glykolyserate, die sich proportional zum Farbumsatz verhält, wird der Anteil der lebenden Zellen indirekt hergeleitet.

Die Messung der Extinktionswerte ($\lambda = 570 \text{ nm}$; Ref. = 650 nm) wird nach 48h vorgenommen; ein Mediumwechsel ist nicht notwendig.

Als Referenzwert wird die errechnete Zellviabilität der Kontrolle (Medium + Zellen) auf 100% definiert.

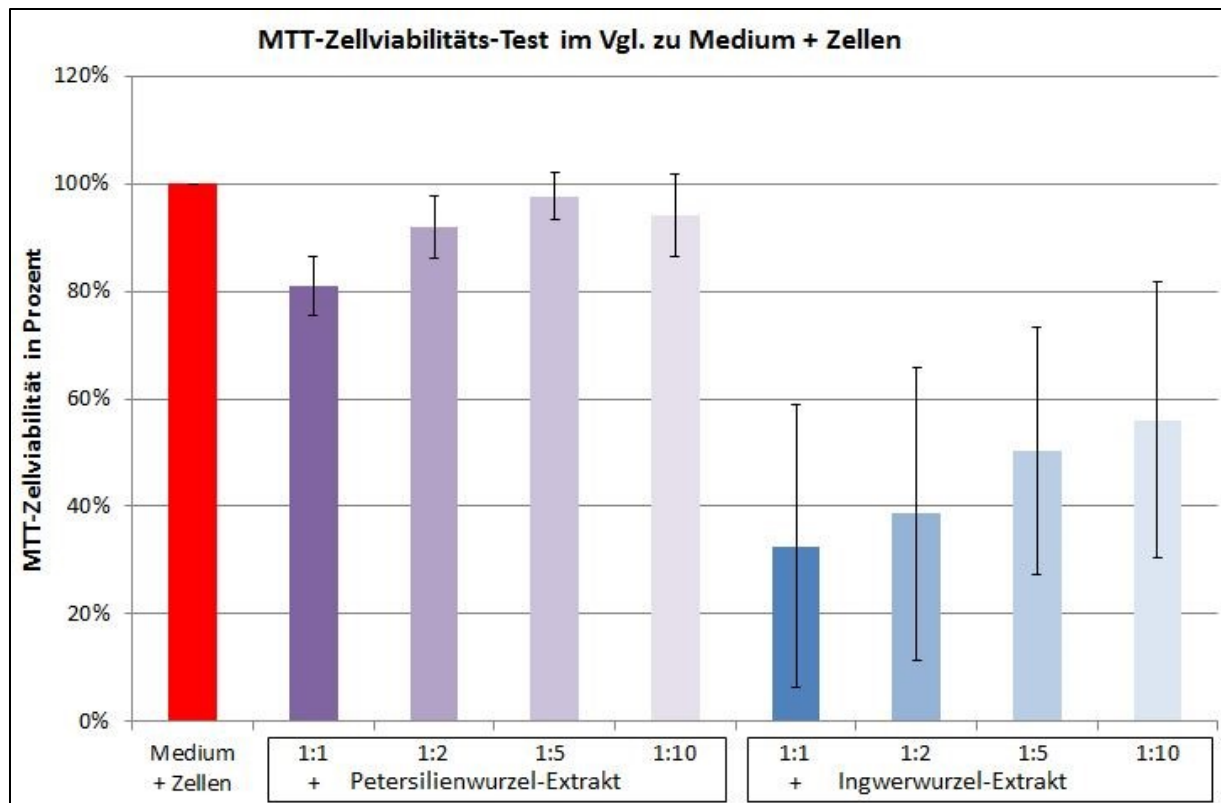


Abbildung 37: Aus 3 Termplazenten gemittelte Zellviabilität mit Standardabweichung

Einige Versuchsdurchläufe lieferten paradoxe Resultate: Bei zwei der fünf Termplazenten lagen die Extinktionswerte des Hintergrunds (Medium) über denen der Referenzprobe (Medium + Zellen), was zum Ausschluss führte. Die Durchführung mit Abruptiomaterial wurde nach dem dritten vergeblichen Versuch auch aus Gründen der Wirtschaftlichkeit abgebrochen. Die oben aufgeführte Abbildung 37 beinhaltet somit einzig Mittelwerte von drei Termplazenten.

Substanzprobe:

Extinktionswerte beider Substanzproben (Med + PWS; Med + Ing) befinden sich gleichauf mit dem Wert des Mediums (Med). Eine Veränderung des Hintergrundwertes durch die Extrakte ist somit nicht anzunehmen. Auf die Illustrierung im Diagramm wurde der Übersicht halber verzichtet.

Substanzabhängigkeit:

Der unverdünnte Petersilienwurzelextrakt senkt die Zellviabilität signifikant auf 81% ($SD \pm 5\%$; $p = 0,039$). Alle weiteren Verdünnungsstufen erreichen nicht das Signifikanzniveau, dennoch scheinen die Mittelwerte einen konzentrationsbedingten Verlauf aufzuzeigen.

Aufsehen erregen die Extinktionswerte der Ingwerproben, die unerwartet niedrig ausfallen. Selbst die zehnfach verdünnte Ingwerextraktprobe verursacht im Mittel eine signifikante Minderung der Zellviabilität auf 56%. Im Verlauf gesehen, sprechen die Mittelwerte der Vergleichsprobe für die Annahme einer Konzentrationsabhängigkeit.

Zellkulturen, die mit der Verdünnungsstufe Ing 1:5 inkubiert wurden, beinhalten im Mittel nur noch einen halb so großen Anteil an lebenden Zellen, wie die Referenzgruppe (Med + Zellen). Der Definition gemäß kommt die 1:5 Verdünnung somit dem IC_{50} -Wert des Ingwerextrakts gleich (IC_{50} -Wert: inhibitory concentration of half-maximal effect).

Im Gegensatz zum LDH- bemisst der MTT-Test nicht den Anteil an untergegangenen Zellen, sondern den metabolischen Umsatz der lebenden Zellen. Dennoch kann der MTT-Test als Zytotoxizitäts-Test interpretiert werden, was die Beurteilung nach Zytotoxizitätsskalen ermöglicht. Erfolgt die Einschätzung anhand der vom Fraunhofer-Institut vorgeschlagenen Skala (103), so sind alle hier getesteten PWS-Extrakte als „nicht zytotoxisch“ zu bewerten (Extinktionsmittelwerte $\geq 81\%$), während die Messwerte der Ingwerproben allesamt unter 60% liegen, was in der maximalen Einstufung „stark zytotoxisch“ resultiert.

3.10 Hormonproduktion

Die durch die Trophoblasten synthetisierten Hormone tragen maßgeblich zum präzisen und zeitgerechten Ablauf der Schwangerschaft bei. Eine durch die Extrakte hervorgerufene Modulation oder Funktionseinschränkungen wären deshalb besonders kritisch zu bewerten. Mit der Spiegelbestimmung des Proteohormons β -hCG sowie dem Steroidhormons 17- β -Estradiol soll mit jeweils einem bedeutenden Vertreter ein Überblick auf die beiden Hauptstrukturgruppen gegeben werden.

Ein Vergleich absoluter Konzentrationswerte stellte sich dabei als nicht zielführend heraus, da die Messwerte zwischen den Plazenten je nach individueller Disposition (Alter der Plazenta, Liegedauer bis zur Präparation) zu sehr schwankten. Aus diesem Grund wurde bei jedem Einzeldurchlauf das Ergebnis der Kontrollprobe (Medium + Zellen) auf 100% normiert und die Probenwerte hierzu in Relation gesetzt. Die weitere Auswertung erfolgt anhand dieser relativierten Ergebnisse.

3.10.1 β -hCG-Konzentration

Das humane Choriongonadotropin (hCG) ist maßgeblich für die Aufrechterhaltung der frühen Schwangerschaft mitverantwortlich. Als Superagonist animiert das Peptidhormon den Gelbkörper (Corpus luteum) solange zur Ausschüttung von Progesteron, bis die reifende Plazenta diese Funktion suffizient übernimmt. Die höchsten β -hCG Konzentrationen werden zwischen der 10. und 12. Woche gemessen und fallen fortan stetig ab. Infolge dessen wurde die Messung nur mit Material aus Abruptionsplazenten durchgeführt. Die β -hCG Messung mit dem Total β -hCG Assay-Kit der Firma Access Immunoassay System® wurde mit 300 μ l abzentrifugiertem Überstand durch das medizinischen Zentrallabor der Klinik Südstadt in Rostock durchgeführt.

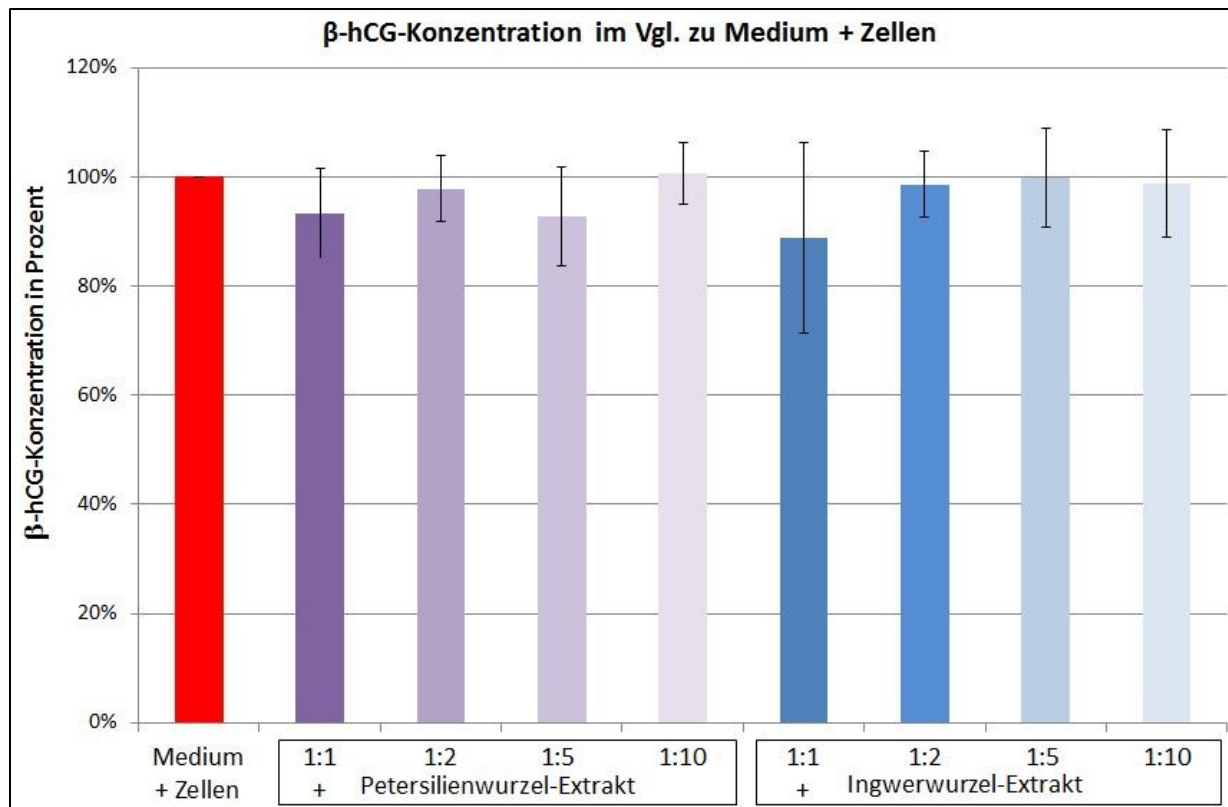


Abbildung 38: Gemittelte, relative β -hCG-Konzentration im Mediumüberstand aus 5 Abruptioproben

Für die illustrierten Mittelwerte wurden 5 Abruptioplazenten ausgewertet. Die Verteilung der Messwerte innerhalb einer Plazenta ist relativ homogen; zwischen den einzelnen Plazenten ist die Differenz mit 370-800 U/Liter jedoch breiter aufgefächert.

Substanzprobe:

Die Substanzprobe wurde für jedes Extrakt einmalig durchgeführt und lag gleichauf zum Medium ($\Delta < 5\%$). Da die Nachweismethode auf einem ebenso hochspezifischen wie sensitiven, nicht-kompetitiven Immunassay beruht, wurde im Weiteren auf eine kostspielige Substanzprobe verzichtet.

Substanzabhängigkeit:

Im Vergleich zum Referenzwert (Medium + Zellen) sind signifikante Unterschiede zu den Messwerten nicht auffindbar. Einzig der Mittelwert der unverdünnten Ingwerprobe (Ing 1:1) liegt mit 89% (gemittelt, SD $\pm 17\%$) etwas unterhalb des Referenzwertes, jedoch nicht signifikant. Dies scheint den Schwankungen der Einzelwerte geschuldet zu sein, die bei Ing 1:1 besonders weit auseinander liegen (SD $\pm 17\%$). Der Petersilienextrakt (1:1) vermindert die hCG-Produktion im Mittel lediglich um 7% (SD $\pm 7\%$). Keine der Proben ändert den hCG-Spiegel signifikant.

3.10.2 17- β -Estradiol-Konzentration

Zusammen mit Progesteron bilden die Estrogene die Strukturgruppe der Steroidhormone. Estron, Estradiol und Estriol rufen im Laufe der Schwangerschaft bei der werdenden Mutter zahlreiche Anpassungsreaktionen hervor, wie beispielsweise die Umwandlung und Ruhigstellung der Uterusschleimhaut und -Muskulatur. Darüber hinaus spielen die Estrogene eine entscheidende Rolle in der zeitlichen Abfolge der Embryonalentwicklung.

Die Bestimmung der Konzentration des 17- β -Estradiols wurde durch die in Schwerin ansässige Firma PRIMACYT Cell Culture Technology GmbH durchgeführt. Dazu wurde nach 144h 500 μ l Überstand kryokonserviert eingeschickt.

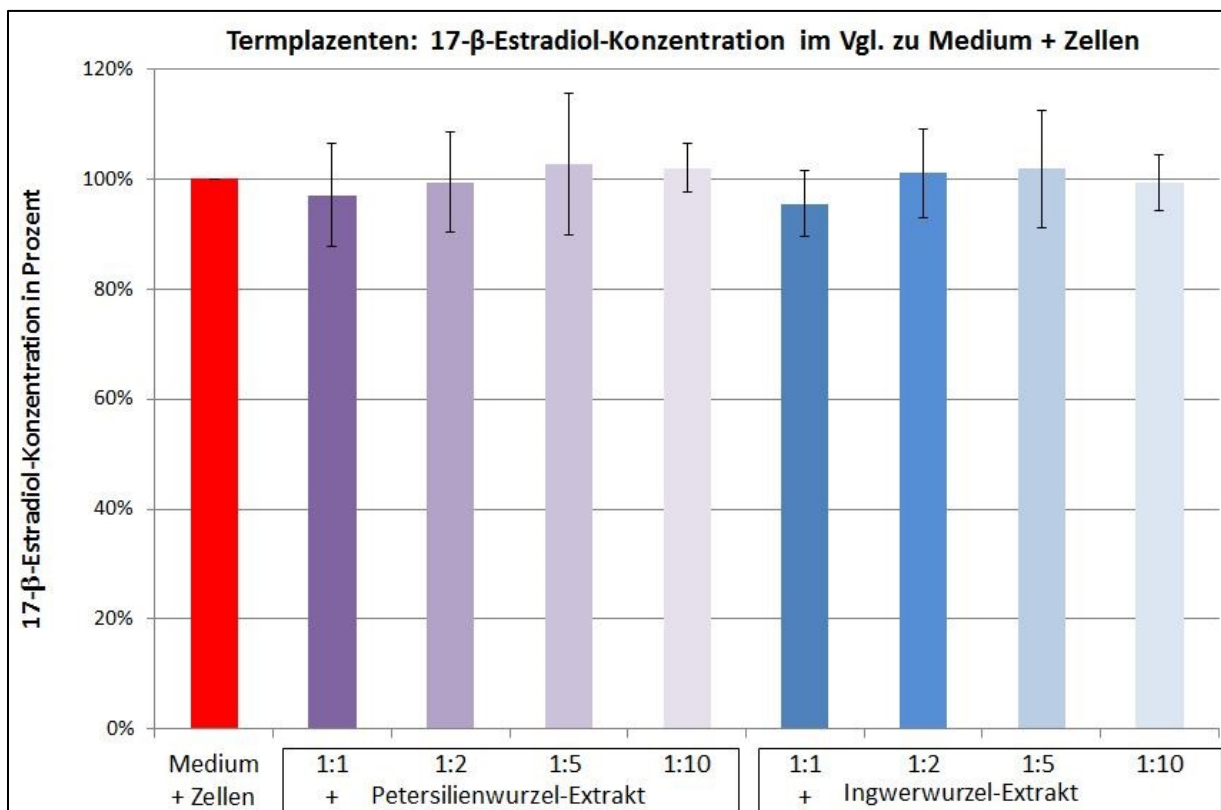


Abbildung 39: Aus 5 Termproben gemittelte relative Estradiol-Konzentration im Überstand nach 144h

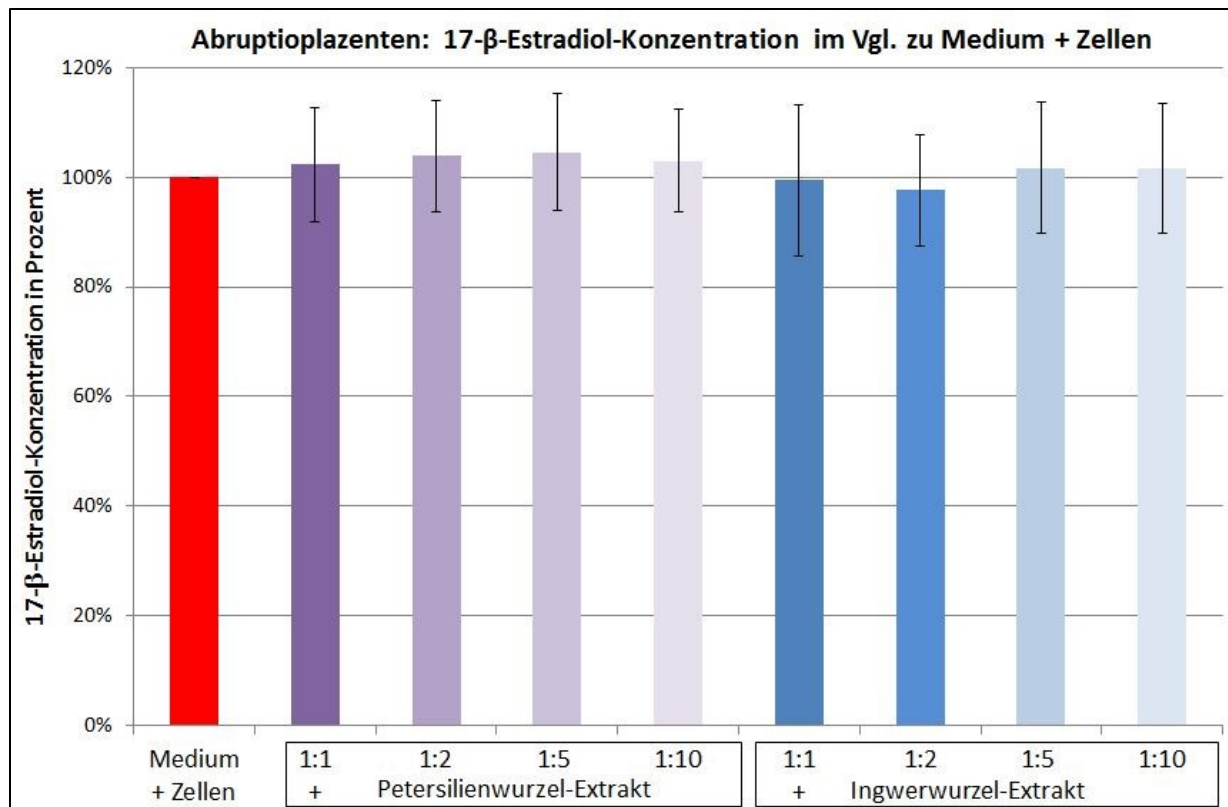


Abbildung 40: Aus 5 Abruptioproben gemittelte relative Estradiol-Konzentration im Überstand nach 144h

Für die Auswertung wurden Messwerte aus jeweils 5 Term- sowie 5 Abruptioplazenten berücksichtigt.

Substanzprobe:

Im Medium wurde ein Hintergrundwert von < 10 pg/ml gemessen. Die Substanzprobe wurde einmal durchgeführt. Beide Extraktverdünnungen lieferten Estradiolmesswerte von < 10 pg/ml. Auf eine Darstellung in der Grafik wird aus Gründen der Übersichtlichkeit verzichtet. Das negative Ergebnis der Substanzprobe lässt die Annahme einer Verfälschung der Estradiolmessungen, welche allein durch die Anwesenheit der Extrakte bedingt ist, als unwahrscheinlich erscheinen.

Wie oben bereits erwähnt, schwanken die absoluten Messwerte von Plazenta zu Plazenta beträchtlich: Die Absolutwerte der Kontrollproben liegen bei den Termplazenten zwischen 419-656 pg/ml mit Mittelwert = 521 pg/ml 17- β -Estradiol und bei den Abruptioplazenten zwischen 305-756 pg/ml mit Mittelwert = 545 pg/ml. Dies macht eine Relativierung zum jeweiligen Kontrollwert (Medium + Zellen) notwendig.

Substanzabhängigkeit:

Die relativierten Messwerte liegen mit maximalen Abweichung von $\Delta = -5\%$ (Term., Ing 1:1) beziehungsweise $\Delta = +5\%$ (Abrupt., PWS 1:5) allesamt sehr nahe am Kontrollwert. Signifikante Unterschiede zu diesem Wert sind nicht auffindbar. Weder Ingwer noch PWS haben in vitro nach

144h (72h unter Extrakteinfluss) eine Suppression der 17- β -Estradiolkonzentration zu Folge. Dies gilt für Material aus Term- ebenso wie für Abruptionplazenten.

4 Diskussion

Diese experimentelle Studie untersucht die Anwendung eines Wurzelextraktes aus Petroselinum crispum (PWS) sowie Zingiber officinale (Ing) an Trophoblastzellkulturen unter in-vitro-Bedingungen. Zunächst werden dazu die Extrakte auf grundlegende Eigenschaften wie pH-Wert und Mineraliengehalt untersucht. Die für die Anlage der Zellkulturen isolierten Trophoblasten stammen aus fünf Term- sowie aus fünf Abruptionplazenten. Der Untersuchungszeitraum beträgt 24 bzw. 144 Stunden. Bei den Versuchen mit 144 Stunden Durchführungszeit wird der ungestörten Synzytiotrophoblastbildung 72 Stunden eingeräumt, bevor eine Inkubation mit den Extrakten erfolgt.

4.1 Untersuchung der Extrakte

4.1.1 Folsäure-, Elektrolyt-, Glucose- und pH-Werte

Die Messung der Elektrolyt- und Glucosekonzentrationen sowie des pH-Wertes galt einer ersten Grundlagensichtung der Substanzen. Wie erwartet, übertrifft die Folsäurekonzentration im Petersilienextrakt den des Ingwers um den Faktor 40. Um eine Vergleichbarkeit mit der von der Deutschen Gesellschaft für Ernährung vorgeschlagenen Tagesdosis an Folat aufzuzeigen, ist eine Umrechnung der SI-Einheit nmol/l hin zu konventionell gebräuchlichen µg/l notwendig. Hierzu wird der jeweilige in SI-Einheiten angegebene Wert mit folgendem Umrechnungsfaktor multipliziert (104):

$$\frac{1}{2,265} \text{ bzw. } 0,441 \left(\times \frac{\mu\text{g/l}}{\text{nmol/l}} \right)$$

Formel 7: Umrechnung der SI-Einheit nmol/l in µg/l

Hieraus ergibt sich, dass die Dosis von ca. 50 ml PWS dem Folat-Bedarf einer Schwangeren entspricht. Ausdrücklich betont werden muss hierbei, dass die Bioverfügbarkeit in dieser Kalkulation noch keine Berücksichtigung findet. Für diese wird im Mittel ein Faktor 0,5 angegeben, was sich jedoch als sehr inkonstant darstellt (2). Des Weiteren gründet diese hypothetische Betrachtung nur auf der Ausgangssubstanz Folat. Eine Aussage über das durch enzymkatalysierte Reduktionsreaktionen gebildete, biologisch aktivierte Tetrahydrofolat ist durch diese in-vitro-Studie nicht möglich. Folglich ist eine Prognose über die tatsächlich aufzunehmende Menge an Folat auf der Grundlage der derzeitigen Datenlage nicht möglich.

Stoff	Petersilienwurzelextrakt in mmol/L	Ingwerextrakt in mmol/L	Verhältnis: Petersilie / Ingwer
Folsäure	2,190	0,0544	40,26
Natrium	18	8	2,25

Stoff	Petersilienwurzelextrakt in mmol/L	Ingwerextrakt in mmol/L	Verhältnis: Petersilie / Ingwer
Kalium	76,7	69,6	1,10
Kalzium	5,28	0,46	11,48
Chlorid	32	40	0,80
Magnesium	16,4	11,34	1,45
Glucose	69,5	29,2	2,38
Eisen	0,0125	0,01	1,25

Tabelle 5: Übersicht der Extraktmessungen. Angaben in mmol/L

Die im weiteren Verlauf gemessenen Mineralienkonzentrationen (Natrium, Kalium, Chlorid, Magnesium) liegen in ähnlichen Größenordnungen, sodass diesbezüglich eine grundsätzliche Vergleichbarkeit der Extrakte angenommen werden kann. Im Vergleich zu Petroselinum weist der Extrakt des Zingiber eine nur halb so hohe Glucosekonzentration auf. Durch die angefertigten Substanzproben wird dennoch ersichtlich, dass die Kulturmedien durch den Unterschied in der Glucosekonzentration keine signifikanten Änderungen erfahren haben.

pH-Messwerte wurden sowohl von den Extrakten als auch von den Substanzproben erhoben, welche parallel zu den Versuchsreihen angelegt wurden. Alle gemessenen Werte bewegen sich in ähnlichen Größenordnungen, sodass auch hier eine prinzipielle Vergleichbarkeit gegeben ist. Der Säure-Base-Haushalt aller Zellkulturen verbleibt über den gesamten Versuchszeitraum in weitgehend konstanten Größen, sodass die Annahme einer überproportionalen Einflussnahme auf die Zellsysteme (Metabolismus, Apoptose-Rate) oder Testreagenzien (MTT, Formazan) durch unterschiedliche pH-Milieus unwahrscheinlich ist.

4.1.2 Feldionisations-Massenspektrometrie (FIMS)

Die Auswertung der Massenspektren gestaltete sich insbesondere bei der Petersilienprobe schwierig. Trotz der interdisziplinären Zusammenarbeit mit dem Institut für Bodenkunde der Universität Rostock bleibt die Zuweisung einiger Spektren ungeklärt. Zu vielen Strukturgruppen fanden sich dennoch einige charakteristische Vertreter, darunter beispielsweise das Antioxidans α -Tocopherol oder die Coumarine Isopimpinellin und Bergapten (siehe 3.2.1).

Die historische Literatur bemisst die abortive Fähigkeit der Petersilie vorwiegend an der Menge des enthaltenen Apiols. Eine Zielsetzung galt folglich der Detektion und gegebenenfalls Quantifizierung des Apiolgehalts in der Probe. Eine eindeutige Feststellung des Apiols gelang jedoch nicht. Dafür wurde mit der geringen Menge an Myristicin eine Substanz ausfindig gemacht, die mit Apiole einen Großteil der Phenylpropanderivate bildet.

Die von Poynter et al. veröffentlichten Daten einer gekoppelten Gas-Chromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) von reinem ätherischen Petersilienöl belegen, dass die Gruppe der Apiole nur in sehr geringen Mengen vorzufinden ist (100), obwohl der im reinen Öl erwartete Anteil ungleich höher ausfallen sollte. Auch in den ausführlichen Dokumentationen von Plazonić et al. findet das vermeintliche Abortivum Apiole keine Erwähnung (101).

Ob Apiole in dem hier vorliegenden Extrakt aus Ingwer tatsächlich nur in vernachlässigbaren Anteilen enthalten ist oder ob sich das Phenylpropanderivat doch hinter einem der unbekannten Spektren verbirgt, vermag diese Arbeit nicht zu klären. Erst eine Verbindung aus Massenspektrometrie und Gas-Chromatographie kann in diesem Zusammenhang ein sicheres Ergebnis liefern (siehe 5. Ausblick). Im direkten Vergleich zur Probe aus der Petersilienpflanze konnten die Inhaltsstoffe der Ingwerprobe in weiten Teilen ausfindig gemacht und zugeordnet werden. Auch hier kommt die einfach durchgeführte Massenspektrometrie nicht an die hohe Auflösung der in der Literatur vorherrschenden Chromatographie-gekoppelten Varianten der Messmethode heran. Dennoch gelang durch das Auffinden von Zingiberenen (α -Phellandrene, α -Zingiberen), Oleoresinen, Gingerolen sowie Shagolen der Nachweis vieler Substanzgruppen, die nach Choudhari (105) und Asadollahi-Baboli (106) zu den Hauptvertretern des Ingwer-Rhizoms zählen (siehe auch 3.2.2). Im direkten Vergleich zur Literatur stellte sich in dieser Arbeit der Anteil an aufgefundenen Zingiberenen als deutlich vermindert dar, derweil die Gruppe der Gingerole alle anderen überwog. Die Differenz dieser Relationen lässt sich wahrscheinlich mit der hohen Flüchtigkeit der Zingiberene begründen: Bereits im entstehenden Vorvakuum wechseln die Zingiberene den Aggregatzustand und entziehen sich somit dem eigentlichen Analyseprozess. Mit dem Wegfall des Zingiberenanteils kann das daraus folgende scheinbare Überwiegen der Gingerole erklärt werden.

4.2 Zellkulturen- und Methodenkritik

4.2.1 Trophoblastkulturen

Der Nachweis der Trophoblastzelle gelingt über die immunhistochemische Anfärbung des Cytokeratin-7, welches sich nach Maldonado-Estrada et al. als spezifischer Trophoblastzell-Marker auszeichnet (98). Auch das Auffinden von β 1-Estrogenrezeptoren spricht für die Anwesenheit von (Synzytio-)Trophoblasten (s. 3.4).

Insbesondere die nach 24h gemessenen Werte der Glucose (3.5) wie auch die pH-Werte (3.6) unterliegen deutlichen Schwankungen. Unter Berücksichtigung dieser Beobachtung und der anfangs überproportional gesteigerten Glucoseaufnahme (bzw. pH-Abnahme) liegt die Vermutung nahe, dass die Trophoblastzellen vor und während des Isolierungsverfahrens einer (Glucose-)Nährstoffkarenz unterliegen. Dies trifft besonders auf die Termplazenten zu, die bis zu acht Stunden in einer

Pufferlösung eingebettet sind, bevor die Präparation beginnt. Das aus dem ambulanten Operationssaal gereichte Abruptiongewebe wird indes direkt präpariert. Dennoch finden sich auch hier Karenzzeiten - beispielsweise während der Inkubation mit den Antikörpern. Die großen Schwankungen der Messwerte nach 24 Stunden könnten als Resultat der uneinheitlich langen Verweildauer gedeutet werden, wonach die Energiedepots der Trophoblasten verschieden stark beansprucht sind. Der Glucosebedarf des Abruptiongewebes fällt hierbei außerordentlich groß aus. Sind die Energiespeicher allerdings erst einmal wieder aufgefüllt, so weist die Messung nach 144h eine vergleichsweise geringe Glucoseaufnahme auf. Die hier vollzogenen Beobachtungen decken sich mit den Dokumentationen von Bax et Bloxam, die differenzierte Untersuchungen zum Zellmetabolismus an Trophoblasten aus Termplazenten durchführten (107). Danach zehrt die Trophoblastzelle unter den anaeroben Bedingungen während der Isolierung zunächst von ihren Glycogenspeichern, welche dann nach der Aussaat innerhalb von 24 Stunden rasch wieder aufgefüllt werden. Dies ist nur durch die gesteigerte Glucoseaufnahme (innerhalb der ersten 6 Stunden) aus dem Nährmedium möglich. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Bildung des Synzytiums auch mit einer Veränderung des Energiehaushalts der Synzytiotrophoblasten einhergeht. Während der Synzytiumsbildung entleeren sich die Glycogenspeicher der entstehenden Synzytiotrophoblasten. Diesmal werden sie jedoch nicht wieder durch Glucoseaufnahme aus dem Medium aufgefüllt, woraus die geringe Differenz der 144h-Messung zur Messung nach 24h erklärbar ist (107).

4.2.2 Methodenkritik

In der vorliegenden Arbeit ist zu beachten, dass für die Auswertung beider Zytotoxizitätsversuche (LDH, MTT) einzig die Daten aus Termplazenten herangezogen werden konnten, da Abruptionmaterial durchweg widersprüchliche Ergebnisse lieferte (siehe 3.9; 3.8). Die wissenschaftliche Literatur zeigt auf, dass MTT- und LDH-Testverfahren an Erst-Trimester-Geweben zur anerkannten Laborpraxis gehören und bei der Durchführung in diesem Zusammenhang keinerlei Probleme beschrieben sind (108) (109). Die LDH-Messwerte der mit Triton X-100 behandelten Abruptionzellkulturen lagen unterhalb der Referenzkontrolle (Medium + Zellen) und oft sogar unterhalb des Hintergrundwertes (Medium), obwohl der Blick durchs Mikroskop eine beinahe vollständige Zelllyse darlegte. Ähnliche Widersprüche traten auch beim MTT-Test auf: Hier überstieg der Hintergrundwert (Medium) die Messwerte der metabolisch aktiven Zellkulturen.

In der Instruktionsanweisung eines LDH-Kits der Firma ANIARA Int. wird auf die potentielle Wechselwirkung mit dem fetalen Kälberserum (FCS) hingewiesen (85). Die daraufhin vorgenommene Reduzierung auf 1% FCS resultierte in gleichen Ergebnissen wie die FCS-freie Mediumlösung, sodass sich der nach 24h durchgeführte Mediumwechsel auf 1%ige FCS-Lösung bei den LDH-Studien als optimale Vorgehensweise herausstellte.

Zwar beruht das Prinzip der Glucosemessung auf einer genauen fotometrischen Glucose-Dehydrogenase-Methode, der Glukose/Laktat-Automat (Biosen) ist jedoch nur auf die im Blut-Serum üblichen Werte geeicht. Da die Ergebnisse zusammen mit den pH-Messungen indes nur einen grundsätzlichen Überblick über den allgemeinen Zellmetabolismus geben, wird das Verfahren in diesem Zusammenhang als ausreichend erachtet. Bei einer gezielteren Fragestellung zu dieser Thematik sollten die hier aufgeführten Ergebnisse jedoch mit entsprechendem Vorbehalt verwendet werden.

Die statistische Auswertung, insbesondere bei den Zytotoxizitäts-Tests, lässt viel Spielraum für Kritik. Zur Verbesserung des Signifikanzniveaus wäre eine Erhöhung der Grundgesamtheit von Nöten, was aber den Rahmen dieser Arbeit überschreiten würde. Um diesem Umstand dennoch weitmöglichst Rechnung zu tragen, wurde auf den Student'schen T-Test zurückgegriffen: Auf der Grundlage statistischer Theorie ermöglicht dieser zumindest eine Abschätzung des Vertrauensintervalls bzgl. der aus den Stichproben ermittelten Mittelwerte in Abhängigkeit vom Stichprobenumfang und einem geforderten Signifikanzniveau.

4.3 Beurteilung der Ingwerprobe

Da Erfahrungswerte im Umgang mit Petersilienwurzelextrakten in der Literatur rar gesät sind, soll der aus dem Rhizom gewonnene Extrakt des Zingiber officinale Vergleichswerte liefern. Seit je her genießen die als Antiemetikum verwendeten Zingiberpräparate besonders in der Gynäkologie einen ausgezeichneten Ruf.

In der großen Mehrheit lagen die gemessenen Werte gleichauf mit denen von Petersilie und hielten sich dabei in einem nachvollziehbaren Verhältnis zur Referenzprobe (Medium + Zellen). Nur die Ergebnisse aus den Versuchen zur Messung des oxidativen Stresses (3.7) sowie der MTT-Zellviabilität (3.9) geben Anlass zu weiteren Diskussionen.

Aus den verschiedenartigen Modellversuchen schlussfolgerte Hinneburg et al., dass Ingwerextrakt kein oder nur geringes antioxidatives Potential aufweist. Angewendet auf Trophoblastzellen führte der Ingwerextrakt in der hier vorliegenden Arbeit sogar zu einer leichten Erhöhung der H₂O₂-Konzentration (vgl. 3.7). Die Behandlung von Trophoblastzellen mit dem Rhizomextrakt ist in der wissenschaftlichen Literatur bis dato noch nicht dokumentiert, weshalb bei der Beurteilung auf themenüberschreitende Literatur aus anderen Fachbereichen zurückgegriffen werden muss. In dieser Arbeit wird die Oxidative Last in der Zellkultur lediglich an der H₂O₂-Konzentration bemessen, wonach der Ingwer-Extrakt eine diskret oxidative Wirkung erzeugt. Andere Arbeiten, beispielsweise aus Bereichen der Diabetesforschung, haben zur Messung der oxidativen Last weitere Untersuchungs-

Parameter miteinbezogen, wonach Ingwer nicht nur in vitro, sondern auch in vivo leicht antioxidativ wirkt (110).

Überraschend erscheinen die Messwerte des Zingiber-Extrakts im MTT-Zellviabilitätstest. Der IC_{50} -Wert (inhibitory concentration of half-maximal effect) des Ingwerextrakts wird bereits bei einem Mischverhältnis von 1:5 erreicht (siehe 3.9). Die mehrfach durchgeführte Substanzprobe widerlegt den zunächst naheliegenden Verdacht auf unspezifische Kreuzreaktionen der Testreagenzien mit dem Ingwerextrakt. Auffallend ist auch die fast linear erscheinende Substanzabhängigkeit, die die Ingwerproben aufweisen. Die Aussagekraft der hier präsentierten Ergebnisse wird jedoch durch die kleine Anzahl an Versuchsdurchführungen relativiert. Bei einem auswertbaren Kollektiv von nur 3 Termplazenten sollte das Ergebnis, trotz der angewendeten statistischen Korrektur-Rechnungen, unter Vorbehalt betrachtet werden (siehe Methodenkritik 4.2.2)

Die Senkung der Zellviabilität ist möglicherweise als Ausdruck eines anticarzinogenen bzw. zytoreduktiven Effekts zu deuten, welcher dem Ingwer und im Besonderen dem enthaltenen 6-Gingerol zugesprochen wird. Im Massenspektrum des Ingwers verdeutlicht der hohe Ausschlag der Gingerol-Gruppe den Anteil, den diese weitgefächerte Substanzgruppe im Rhizom innehat. Mit einem methanolischen Extrakt aus Ingwerblättern gelingt Park et al. die signifikante Senkung der Zellviabilität von Zelllinien aus Mamma- (MCF-7, MDA-MB-231), Hepatozellulär- (HepG-2), sowie Kolorektal-Karzinomen (HCT116, SW480) (111).

Die abschließende Beurteilung des Ingwerextrakts –insbesondere unter Berücksichtigung der Zusammenführung der Ergebnisse aus MTT-Test und H_2O_2 -Konzentrationmessung– fällt teils gegensätzlich aus. In dieser Studie ist eine Senkung der Zellviabilität (MTT) ebenso wie ein Anstieg der oxidativen Belastung von Trophoblastzellen bei Zugabe von Ingwer-Extrakt unter in-vitro-Bedingungen zu beobachten. Dies wären gewichtige Argumente, die eine Verwendung von Ingwerpräparaten in der Schwangerschaft in Frage stellen würden. Eine direkte Übertragung dieser in-vitro-Ergebnisse auf in-vivo-Umgebungen ist jedoch nicht zielführend, denn dem gegenüber existiert eine Vielzahl an Literaturstellen, welche die gefahrlose Ingwereinnahme in der Schwangerschaft aufzeigen. Neben den fachfremden in-vitro-Studien sind darunter auch einige doppelt randomisierte in-vivo-Studien (65) zu finden, die dem Ingwerrhizom generell gute Verträglichkeit bei gleichzeitig präziser antiemetischer Wirkung zusprechen, was sich letztlich auch mit den langjährigen Anwendungserfahrungen im klinischen Umgang deckt (68).

4.4 Beurteilung des Petersilienwurzelextrakts

4.4.1 Literaturrecherche

Historische Quellen beschreiben eindrücklich, wie die Einnahme von Apiol-Präparaten zu Intoxikationen und schließlich zum Abort führten (54).

Wie unter 1.5.2 eingehend aufgeführt, erfolgte um 1930 eine versehentliche Beimischung des stark toxischen Triorthokresylphosphorsäureester zu Apiol-Präparaten welche üblicherweise aus Petersiliensamen gewonnen wurden. Angefangen mit Symptomen einer Polyneuritis, trat als Folge der Ester-Intoxikation alsbald ein Abort ein. Fortan betrachtete die Bevölkerung das aus der Petersilie gewonnene Apiol als starkes Aprotikum, obwohl bereits wenige Jahre später der Triorthokresylphosphorsäureester als ausschlaggebendes Toxin identifiziert werden konnte (48).

4.4.2 Allgemeiner Zellmetabolismus und Lichtmikroskopie

Die Entwicklung und Synzytiumbildung der gewonnenen Trophoblastzellen wurde mit dem Lichtmikroskop nachvollzogen. Wie von Kliman et al. (71) beschrieben, formten sich die erst einzeln liegenden Trophoblasten innerhalb von 72 Stunden über Aggregations- und Verschmelzungsschrittchen hin zu mehrkernigen Synzytiotrophoblasten. In den Beobachtungen der Lichtmikroskopie konnte kein Unterschied zwischen Abruptio- und Termplazenten ausgemacht werden. Ebenso wenig schienen die getesteten Extrakte einen Einfluss auf die Morphologie der Zellen wie auch auf den zeitlichen Verlauf der Synzytiumbildung zu haben.

Die Messung des pH-Werts sowie des Glucosegehalts geben Einblick in den grundlegenden Metabolismus der Zellkulturen. Der Extrakt aus der Petersilienwurzel vermag es nicht, einen dieser Parameter signifikant zu verändern. Dies gilt sowohl für Gewebe aus Abruptio- als auch aus Termplazenten. Diese Beobachtung wird grundsätzlich durch die Zytotoxizitäts- und Zellviabilitätstests gestützt. Im LDH-Test zeigten sich die Messwerte der Petersilienwurzel nicht signifikant erhöht. Gemäß der Einteilung der vom Fraunhofer-Institut vorgeschlagenen Zytotoxizitätsskala sind auch die gemittelten Werte des Petersilienextrakts im LDH-Test (13% im Vgl. zu Triton) sowie im MTT-Test (81% im Vgl. zur Referenzgruppe) als „nicht zytotoxisch“ zu bewerten. Der LC₅₀-Wert wird deutlich unterschritten. Genauere Informationen über den zu Grunde liegenden Mechanismus der Zytotoxizität und den damit einhergehenden Zelluntergang (Nekrose/Apoptose) können beide Versuche nicht liefern. Generell decken sich diese Ergebnisse mit den Erfahrungen, die Lantto et al. mit der Anwendung eines Petersilienextraktes auf Neuroblastom- (SH-SY5Y) und Fibroblast-Zelllinien (CV1-P) dokumentierten (112). Das aus getrockneten Petersilienblättern

gewonnene, durch Destillation von ätherischen Ölen befreite, wässrige Extrakt beeinflusste weder die Zellmembranintegrität (LDH) noch hatte es Auswirkung auf die metabolische Aktivität (MTT) der getesteten Zelllinien. In einer darauf folgenden Studie zeigten Dorman et al., dass ein entfettetes, in Alkohol angereichertes Extrakt aus Petersilienblättern, angewendet auf Melanom- (A375) und Fibroblastzellen (CV1-P), sich erst in Konzentrationen von 1,5 bis 2,0 mg/ml als leicht zytotoxisch erwies. Da in diesen Versuchen Caspase-3 vermittelte Apoptose als Ursache ausgeschlossen werden konnte, verweisen die Autoren auf mögliche prooxidative Substanzen des Extraktes, welche Anteil an der zytotoxischen Wirkung haben könnten (113).

4.4.3 Hormonsyntheseleistung

Über endokrine, parakrine sowie autokrine Mechanismen ist der Synzytiotrophoblast mit seiner Hormonsyntheseleistung unter anderem für die Implantation und Aufrechterhaltung der Schwangerschaft, ebenso wie für die Adaptation des mütterlichen Organismus und der zeitgerechten Entwicklung des Fetus mitverantwortlich. Dies unterstreicht den Stellenwert dieser Trophoblastzellfunktion. Mit der β -hCG- sowie 17- β -Estradiol-Konzentrationsmessung im Medium wurde jeweils ein wichtiger Vertreter der Peptid- wie auch der Steroid-Strukturgruppe quantifiziert.

Die Wurzelsaft-Extrakte führten in den Zellkulturen zu keiner signifikanten Änderung der hCG-Peptidhormonkonzentrationen. Zu beachten ist, dass die Bestimmung der hCG-Konzentration aus oben genannten Gründen nur an den Abruptiongeweben vorgenommen wurde. Referenzwerte für diese Art der Syntheseleistung finden sich in der Literatur wenig. Mit ähnlicher Zell-Isolierungsmethode messen Kao et al. (114) in vitro mit Trophoblasten aus Termplazenten nach 96h einen hCG-Gehalt von ca. 230 U/Liter. Die Verwendung von Trophoblasten aus frühen Abruptiongeweben (10.-12. Woche p. c.) ist sehr wahrscheinlich der Grund dafür, dass die Messwerte in der vorliegenden Studie mit 370-800 U/Liter deutlich höher ausfallen.

In dieser Arbeit wurde bewusst die Bestimmung von Estradiol der von Progesteron vorgezogen: Progesteron wird zwar ebenso in der Plazenta gebildet und übernimmt wichtige Funktionen in der Aufrechterhaltung der Schwangerschaft, im Gegensatz zum Estradiol ist die Trophoblastzelle jedoch nicht progesteronsensibel (18).

Die Beurteilung der Hormonsyntheseleistung durch die β -Estradiol-Konzentration erfolgte vergleichend mit den Dokumentationen von Richter et al (115). Aus Termplazenten ergaben sich (absolute) Estradiol-Konzentrationen von 419-656 pg/ml (Mittelwert = 521 pg/ml); Abruption-Gewebe lieferte 305-756 pg/ml (Mittelwert = 545 pg/ml) (vgl. 3.10.2). Die Ergebnisse aus beiden Plazenta-Arten stehen in Einklang zu den Dokumentationen von Richter et al., die einen Mittelwert für Termplazenten von ca. 550 pg/ml ausweisen (115).

Die Interpretation der im Medium gemessenen 17- β -Estradiol-Konzentration ist eindeutig: Unter Berücksichtigung der Standardabweichung implizieren die Messwerte, dass beide Pflanzenextrakte keinen signifikanten Einfluss auf die Estradiolsyntheseleistung der Synzytiotrophoblasten nehmen. Dies ist nicht selbstverständlich, da die Petersilie eine ganze Reihe von (Iso-)Flavonoiden enthält, deren phytoestrogene Wirkkomponenten sich beispielsweise auf die estrogenabhängige Synzytiumbildung (18) auswirken könnten. Apigenin, welches in vitro eine hemmende Wirkung auf die Aromastase ausübt (116), bildet mit 510-630mg pro 100g Petersilie den größten Anteil der Flavonoide (34). Daneben finden sich viele weitere Inhaltsstoffe, denen in vitro hormonmodulierende Eigenschaften nachgewiesen wurden: Die Flavone Apiin (das Aglycon des Apigenin), Luteolin und Quercetin, das Isoflavon Genistein (1539.70mg/100g Petersilie) (33) wie auch die im ätherischen Öl nachweisbaren Phenylpropane (117), deren Hauptkomponenten Myristicin und Apiol sind. Monteiros Experimente an Chorinkarzinomzelllinien (JAR) zeigen, dass viele der hier aufgezählten Substanzen eine Senkung der in-vitro-Estrogensyntheseleistung zur Folge haben. Da die Genexpression des Enzyms unangetastet bleibt, darf gefolgert werden, dass die Modulation der Aromastase-Enzymaktivität direkt durch die Extrakt-Substanzen ausgelöst wird (117). Zumindest für Apigenin liegen in-vivo-Daten vor. Diese belegen, dass eine Diät mit dem Flavon keinen Einfluss auf das Gewicht eines Rattenuterus nimmt, was eine Modulation des Aromastase-Enzyms in vivo unwahrscheinlich macht. Der Grund ist vermutlich in der unzureichenden Absorption im Magen-Darm-Trakt auszumachen (118). In Anbetracht der großen Anzahl an potenziell phytoestrogen wirkenden Substanzen in der Petersilie ist es nicht möglich, in diesem Zusammenhang eine fundierte Prognose über den Einsatz des PWS unter in vivo Bedingungen zu formulieren.

4.4.4 Oxidativer Stress

Über die Bedeutung oxidativer Prozesse in der jungen Plazenta wird kontrovers debattiert, wenngleich sich die Forschung zum Teil noch auf Grundlagenniveau befindet. Bekannt ist, dass gerade im ersten Tertial der Schwangerschaft durch nicht hinreichend fortgeschrittene Vaskularisierungsprozesse minderperfundierte Plazentaabschnitte entstehen, in denen sich eine hohe oxidative Last ausbilden kann. In der frühen Schwangerschaft ist dieser Zustand mit Plazentafehlbildungen, Präeklampsie und intra-uterinem Fruchttod verbunden; in der fortgeschrittenen Gravidität tritt die Häufung der Adipositaswahrscheinlichkeit hinzu (90). Andererseits ist die Forschung der Lebensmittelindustrie auf die antioxidativen Wirkkomponenten der Petersilienpflanze aufmerksam geworden. Die im Jahr 2005 von Hinneburg et al. veröffentlichte Untersuchung zeigt zunächst, dass die antioxidative Leistungsfähigkeit der getesteten Kräuter wesentlich mit dem Gehalt an phenolischen Inhaltsstoffen korreliert (39). Der durch Hydrodestillation erhaltene, wässrige Petersilienextrakt wurde in den in-vitro-Studien an verschiedenen

Oxidationsmodellen untersucht. Bei fast allen in vitro Modellversuchen wird dem Petersilien-Extrakt ein vergleichsweise starkes antioxidatives Potential zugesprochen. Dabei fand speziell das Untersuchungsmodell zur Quantifizierung der Eisen(II)-Chelatierung Beachtung. Durch Chelatierung wird den im Medium enthaltenen Übergangsmetallen die enzymatische Fähigkeit entzogen, die für die Bildung vieler ROS mitverantwortlich ist. Der in diesem Zusammenhang untersuchte Petersilienextrakt generiert von allen getesteten Pflanzenextrakten die weitreichendste Chelat-Bildung (39). Überdurchschnittlich werden auch die radikalfangenden Eigenschaften des Extraktes bewertet, die hauptsächlich auf die Apigenin-Komponente zurückgeführt werden. Neben dem frühzeitigen Ergreifen von Hydroxyl-Radikalen, was die Abstopfung von Lipidoxidation bedingt (119), hielten die antioxidativen (Phenol-)Komponenten des Petersilienextraktes viele weitere Radikale zurück, darunter Alkylperoxid-, $O_2^{\cdot-}$ - sowie NO^{\cdot} -Radikale (39).

Zwar erfahren alternative Ernährungs- und Heilmethoden gerade bei Schwangeren große Aufmerksamkeit, dennoch ist eine Zusammenführung der Ergebnisse beider Forschungsgebiete bisher noch nicht erfolgt, sodass diese Arbeit zumindest in kleinem Umfang Aussagen zu dieser Thematik beizutragen vermag.

Der oxidative Stress, also das Überwiegen der oxidativen- über die antioxidativen Prozesse in der Zellkultur, wurde in dieser Dissertation durch die Konzentrationsmessung von H_2O_2 im Medium quantifiziert. Neben dem Nichtradikal H_2O_2 existieren noch zahlreiche weitere reaktive Sauerstoffspezies (ROS), von deren Reaktionsketten viele in ein Wasserstoffperoxid-Produkt münden, sodass sich dieser Parameter als relativ stabiler Marker für das oxidative Geschehen etablierte (120). Grundsätzlich bestätigten die zu dieser Arbeit durchgeführten Versuche die in den einzelnen Fachgebieten dokumentierten Erfahrungen.

In den Zellkulturen, die 72h lang mit Petersilienwurzelextrakt inkubiert wurden, fand ein leichter, aber dennoch signifikanter Abfall der oxidativen Last statt (vgl. 3.7). Im Vergleich zu den Dokumentationen von Dorman und Hinneburg (39) ist die Größenordnung der in dieser Arbeit ermittelten H_2O_2 -Senkung eher als moderat einzustufen. Der naheliegendste Grund für die im Vergleich zur Literatur unterschiedliche antioxidative Leistung liegt vermutlich im verwendeten Pflanzenteil, wobei die hier genutzte Wurzel wohl einen geringeren Anteil an phenolischen Komponenten aufweist als die Stängel und Blätter der Petersilie, die Dorman und Hinneburg nutzten. Die lineare Korrelation des Phenolgehaltes zur antioxidativen Leistung würde auch die beobachtete Substanzabhängigkeit des PWS erklären, denn der Extrakt schließt mit abnehmendem Konzentrationsanteil zu den Werten der Referenzprobe (Medium + Zellen) auf.

Grundsätzlich ist zu erwähnen, dass alle gemessenen H_2O_2 -Konzentrationen sich unterhalb der von Kohen et. al. angegebenen kritischen Grenze von $10 \mu\text{mol/l}$ befinden, sodass durch diesen Faktor keine relevante Wechselwirkung mit den Zellkulturen anzunehmen ist (89).

4.5 Fazit

Diese Studie untersucht die Wirkung eines Petroselinumwurzelsaftes (PWS) auf Trophoblastzellkulturen. Dies soll erste Erkenntnisse erheben, um das Pflanzensaftextrakt als Ergänzungs- oder gar Alternativmethode zur synthetischen Folsäure-Supplementierung anzuerkennen.

Historische Quellen sagen dem in der Petersilie enthaltenem Apiol abortive und toxische Wirkung zu. Die Literaturrecherche zeigte, wie um 1930 durch versehentliche Beimischung eines stark toxischen Esters zu Apiol-Präparaten der Irrglaube entstand, demzufolge Petersilie ein potentes Abortivum sei. Obwohl in dieser Arbeit die Anwesenheit des als abortiv geltenden Phenylpropanderivats Apiol durch die massenspektrometrische Nachweismethode nicht sicher ausgeschlossen werden kann, zeigen die durchgeführten Experimente auf Basis der (Synzytio-)Trophoblastenkulturen wenig Anhaltspunkte, die auf ein abortives Geschehen hinweisend sein könnten.

Keines der beiden Extrakte erwies sich im LDH-Testverfahren als signifikant zytotoxisch.

Die Zellviabilität wurde mithilfe eines MTT-Kits bestimmt. Während der Extrakt aus Petersilienwurzel keinen signifikanten Einfluss auf die Zellviabilität hatte, führte die Ingwerzugabe zu einer signifikanten Absenkungen der Zellviabilität: Bereits bei der Zugabe von 1:5 verdünnter Ingwerprobe sinkt die im MTT-Test gemessene Zellviabilität auf nur noch 50% ab, was folglich dem IC_{50} -Wert (inhibitory concentration of half-maximal effect) des Ingwerextraktes entspricht.

Dennoch gilt die Anwendung der Vergleichssubstanz Ingwer in der Schwangerschaft als weitgehend unbedenklich.

Daneben finden sich, abgesehen von der erwarteten, leicht antioxidativen Wirkung des PWS, kaum Unterschiede zur Vergleichsprobe. Der im Lichtmikroskop nachvollzogene Verlauf der Synzytiumbildung erscheint von den beiden Wurzel-Extrakten ebenso unbeeinflusst wie der grundlegende Zellmetabolismus, der mittels Messung der Glucosekonzentration und des pH-Wertes im Mediumüberstand nachvollzogen wurde. Von den Extraktzugaben gleichermaßen unverändert stellen sich die Hormonkonzentration des β -Estradiol sowie des β -hCG dar. Aufgrund der integralen Funktion, welche die Synzytiotrophoblasten durch ihre Hormonsyntheseleistung zum Plazentasystem beitragen, finden diese beiden Parameter gesonderte Gewichtung in der Beurteilung.

Zusammenfassend bietet diese in-vitro-Studie hinsichtlich der Wirkung auf Trophoblastzellen wenige Anhaltspunkte, die gegen eine Folsäuresubstitution durch natürlichen Petersilienwurzelsaft sprechen.

5 Ausblick

Rückblickend offenbart diese Arbeit einige Themenbereiche, zu denen ein zukünftiges Forschungsengagement wünschenswert erscheint. Eine Kopplung der Massenspektrometrie an eine Gas-Chromatographie erhöht die Auflösung zur Detektion der Inhaltsstoffe deutlich. Erst hierdurch könnte ein Ausschluss des Apiols verifiziert werden. Der Einsatz dieses aufwendigen Verfahrens ist jedoch wesentlich durch die verfügbaren Ressourcen limitiert. Angemessener erscheinen deshalb zunächst weiterführende Untersuchungen, die eine zytotoxische Wirkung des Petersilienextraktes auch an Abruptio-Gewebe ausschließen können. Hierzu wäre beispielsweise ein Versuchsablauf mit einem Cell-Death-Detection-ELISA^{PLUS}-Kit denkbar, welches dazu eine Differenzierung zwischen Nekrose bzw. Apoptose leisten könnte.

Allein schon die große Anzahl an potentiell schädlichen Wirkstoffen (beispielsweise Myristicin), welche die Petersilienwurzel enthält, schließt einen simplen Transfer der Ergebnisse dieser Arbeit auf in-vivo-Bedingungen aus. Ebenso wenig dürfen bei zukünftigen Übertragungen auf in-vivo-Szenarien die phytoöstrogenen Wirkkomponenten außer Acht gelassen werden, die der *Petroselinum crispum* in großer Zahl innewohnen.

Erst nach weiteren Untersuchungen von in-vitro-Modellen, die Teile des Schwangerschafts- und Geburtsprozesses thematisieren (beispielsweise hinsichtlich der Substanzwirkung auf die Uterusmuskulatur), erscheint eine pharmakokinetische Beurteilung des Petersilienextraktes zweckmäßig.

Abgesehen vom Petersilienextrakt erregt die Vergleichsprobe Ingwer in dieser Studie durch eine deutliche Absenkung der Zellviabilität Beachtung. Diese Beobachtung auf in-vitro-Basis widerspricht zwar aktuellen und großangelegten in-vivo-Studien aus der Geburtshilfe, allerdings sorgt die zytoreduktive Wirkung einiger Ingwer-Komponenten, wie beispielsweise 6-Gingerol, auch in der derzeitigen Onkologie-Forschung für Aufsehen. Zur Verifizierung der Ergebnisse ist beispielsweise der XTT-Zellviabilität-Test als colorimetrisches Prinzip analog zum MTT oder eine Überprüfung durch Zellzählung nach Trypanblau-Färbung in Erwägung zu ziehen. Schließlich könnte auch hier der Cell-Death-Detection-ELISA-Test eine genauere Differenzierung ermöglichen.

6 Zusammenfassung

Das Interesse an einer gesunden Ernährung auf pflanzlicher Basis findet auch in der Geburtshilfe regen Anklang. Mit einem von Natur aus hohen Folsäuregehalt präsentiert das Forschungslabor der Universitätsfrauenklinik Rostock einen Petersilienwurzelsaft als natürliche Alternative zum synthetisch produzierten Vitamin. Historischen Berichten zu Folge soll die Einnahme der Arzneipflanze *Petroselinum crispum* jedoch mit einer Abortinduktion einhergehen. Diese Behauptung konnte durch Literaturrecherche weitgehend widerlegt werden: Bereits um 1930 konnten die in diesem Zusammenhang auftretenden schweren Vergiftungserscheinungen auf eine Beimischung eines Esters zurückgeführt werden. Allerdings blieb diese Erkenntnis bei der gebrauchenden Bevölkerung weitgehend unbeachtet.

Ziel der vorliegenden in-vitro-Studie war es, den Einfluss eines Wurzel-Extraktes aus *Petroselinum crispum* auf primäre, humane Trophoblastzellen zu untersuchen, die aus fünf Term- sowie fünf Abortio-Plazenten isoliert wurden, und den Effekt mit dem eines Extraktes von Ingwer zu vergleichen. Dazu wurden zunächst Proben beider Wurzeln massenspektrometrisch analysiert. Apio, das Phenylpropanderivat, dem die historischen Quellen die Hauptrolle beim Abortgeschehen zuschreiben, konnte hierdurch nicht eindeutig nachgewiesen bzw. ausgeschlossen werden.

Darüber hinaus liegt der Schwerpunkt dieser Arbeit auf der Untersuchung der mit Extrakt behandelten Trophoblastzellkulturen. Die Isolierung der Trophoblasten erfolgte nach Kliman et al. (71), und leicht modifiziert nach Jeschke et al. (72) (71): Einer initialen Präparation der Plazenta folgten Verdauungsschritte sowie Erythrolysedurchläufe. Die eigentliche Separation der Trophoblasten gelang bei den Termplazenten mit einer Dichtegradientenzentrifugation, während beim Abortio-Material eine Antikörper-vermittelte Auftrennung im Magnetfeld (MACS) notwendig war. Das Isolat wurde immunhistochemisch mit dem trophoblastellspezifischen Marker Cytokeratin-7 sowie durch den β 1-Estrogenrezeptor charakterisiert.

Während sich im LDH-Testverfahren keines der beiden Extrakte als signifikant zytotoxisch erwies, führte die Zugabe von Ingwer-Extrakt zu einer signifikanten Absenkung der Zellviabilität im MTT-Test. Bewertet anhand der Glucoseaufnahme, pH-Wertemessungen und der Beurteilung des mikroskopischen Erscheinungsbildes, zeigte sich der übrige Zellmetabolismus unbeeinflusst von der Extraktzugabe.

Zu den integralen Funktionen des Synzytiotrophoblasten zählt die Hormonsyntheseleistung, die anhand der β -hCG- (nur Abortiomaterial) sowie β -Estradiol-Konzentration quantifiziert wurde. Im

Rahmen der Messgenauigkeit wurden hierbei keinerlei signifikante Veränderungen zur Referenz festgestellt.

In vorausgegangenen in-vitro-Studien wird das antioxidative Potential der Petersilie betont. In dieser Studie war jedoch nur eine vergleichsweise geringe Absenkung der H_2O_2 -Konzentration auszumachen.

Die durchgeführten Messungen belegen den hohen Folsäuregehalt der Petersilienwurzel. Die in-vitro-Untersuchungen der Lichtmikroskopie, des Zellmetabolismus und im Besonderen der Hormonsyntheseleistung resultieren in zur Referenzprobe unbeeinflussten Ergebnissen. Dabei liegen die Messwerte weitestgehend gleichauf mit denen von Ingwer, der als unbedenkliches Antiemetikum bereits seit Langem Verwendung findet. Auf der Grundlage der durchgeführten Analyse der Wirkung des Petroselinumwurzelextrakts auf Trophoblastzellen ergibt diese in-vitro-Studie somit kaum Anhaltspunkte, die eine abortive Wirkung des Petroselinumwurzelextrakts vermuten ließen.

7 Thesen zur Promotionsschrift

Thema: Petroselinum crispum und Zingiber officinale in einer
Trophoblastfunktion-in-vitro-Studie

Eingereicht von Jens Haumann

1. Vor allem in der frühen Schwangerschaft besteht ein erhöhter Folsäurebedarf.
2. Besonders in der Embryonalentwicklung korreliert ein Folatmangel mit der Häufigkeit von Neuralrohrdefekten, wie Spina bifida und Anenzephalie. Eine frühzeitig eingeleitete Folsäuresubstitution vermindert signifikant das Auftreten von Neuralrohrdefekten.
3. Ein Saftextrakt aus Petersilienwurzeln beinhaltet eine hohe Konzentration an Folsäureäquivalenten.
4. Der auf gleiche Weise gewonnene Ingwer-Extrakt eignet sich in diesem Rahmen als Vergleichssubstanz.
5. In-vitro erfolgen wesentliche Untersuchungen zum Zellmetabolismus aus 10 primären Trophoblastzellkulturen, die jeweils zur Hälfte von Abruptionen aus der 10.-12. Woche p. c. wie auch aus reifen Termplazenten isoliert werden.
6. Die durch immunhistochemische Färbung markierten Merkmale (Cytokeratin-7, β -ER) charakterisieren Trophoblastzellen.
7. Die aus humanen Geweben gewonnenen Trophoblastzellsuspensionen gehen unter den gegebenen Bedingungen innerhalb von 72h eine Synzytiumbildung ein.
8. Die in-vitro gebildeten Synzytien haben eine vergleichbare Hormonsyntheseleistung.
9. In-vitro nimmt der Petroselinum-Extrakt keinen erkennbaren Einfluss auf den grundsätzlichen Metabolismus (Glucose, pH, Mikroskopie) der Trophoblastzelle.
10. Während der Petersilienwurzel-Extrakt keine signifikante Zytotoxizität im LDH-Test ausübt, führt die Vergleichssubstanz Ingwer im MTT-Test zu einer deutliche Absenkung der Zellviabilität auf nur noch ein Drittel.
11. 18- β -Estradiol und β -hCG sind als Hauptgruppenvertreter der Steroid- und Progesteronhormone zur prinzipiellen Überprüfung der Hormonsyntheseleistung geeignet.
12. Die Hormonsyntheseleistung von β -hCG und β -Estradiol durch den Synzytiotrophoblasten bleiben durch die Zugabe der Wurzelsaftextrakte weitgehend unangetastet.
13. Der Saftextrakt aus der Petersilienwurzel erwirkt in-vitro eine leichte Senkung der oxidativen Last.

8 Referenzen

1. B. Koletzko, K. Pietrzik, Gesundheitliche Bedeutung der Folsäurezufuhr, *Dtsch Arztebl International*. **101**, 1670 (2004).
2. *Dietary reference intakes for thiamin, riboflavin, niacin, vitamin B₆, folate, vitamin B₁₂, pantothenic acid, biotin, and choline* (National Academy Press, Washington, D.C., 1998).
3. *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie* (Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, ed. 9, 2014).
4. Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR), *Jod, Folat/Folsäure und Schwangerschaft* (2014) (available at <http://www.bfr.bund.de/cm/350/jod-folat-folsaeure-und-schwangerschaft.pdf>).
5. Hessisches Ministerium für Umwelt, Klimaschutz, Landwirtschaft und Verbraucherschutz, *Folsäure - besonders wichtiges Vitamin in der Schwangerschaft*, <http://www.verbraucherfenster.hessen.de> (2014) (available at http://verbraucherfenster.hessen.de/irj/VF_Internet?rid=HMULV_15/VF_Internet/nav/c37/c3733a3c-a9ee-611a-eb6d-f144e9169fcc,1d760d5d-e6e1-0d31-f012-f312b417c0cf,,,11111111-2222-3333-4444-100000005002%26_ic_seluCon=1d760d5d-e6e1-0d31-f012-f312b417c0cf%26shownav=false.htm&uid=c3733a3c-a9ee-611a-eb6d-f144e9169fcc&shownav=false).
6. Deutsche Gesellschaft für Ernährung (DGE), *Referenzwerte für die Nährstoffzufuhr, Folat* (2013).
7. R. J. Berry *et al.*, Prevention of neural-tube defects with folic acid in China. China-U.S. Collaborative Project for Neural Tube Defect Prevention, *N. Engl. J. Med.* **341**, 1485–1490 (1999), doi:10.1056/NEJM19991113412001.
8. R. W. Smithells *et al.*, Apparent prevention of neural tube defects by periconceptional vitamin supplementation. 1981, *Int J Epidemiol.* **40**, 1146–1154 (2011), doi:10.1093/ije/dyr143.
9. W. Herrmann, R. Obeid, The mandatory fortification of staple foods with folic acid: a current controversy in Germany, *Dtsch Arztebl Int.* **108**, 249–254 (2011), doi:10.3238/arztebl.2011.0249.
10. C. Roth *et al.*, Folic acid supplements in pregnancy and severe language delay in children, *JAMA.* **306**, 1566–1573 (2011), doi:10.1001/jama.2011.1433.
11. G. A. Nakouzi, J. H. Nadeau, Does dietary folic acid supplementation in mouse NTD models affect neural tube development or gamete preference at fertilization?, *BMC Genet.* **15**, 91 (2014), doi:10.1186/s12863-014-0091-x.
12. K. L. Moore, Persaud, Trivedi V. N, C. Viebahn, *Embryologie, Entwicklungsstadien : Frühentwicklung ; Organogenese ; Klinik* (Elsevier, Urban & Fischer, München [u.a.], ed. 5, 2007).
13. J. Baltzer, *Praxis der Gynäkologie und Geburtshilfe, Das komplette Praxiswissen in einem Band ; 321 Tabellen* (Thieme, Stuttgart [u.a.], ed. 1, 2004).
14. G. Martius, *Gynäkologie und Geburtshilfe, 117 Tabellen* (Thieme, Stuttgart, New York, NY, ed. 5, 2008).
15. D. Evain-Brion, A. Malassine, Human placenta as an endocrine organ, *Growth Hormone & IGF Research.* **13**, S34-S37 (2003), doi:10.1016/S1096-6374(03)00053-4.
16. U. Drews, *Taschenatlas der Embryologie* (Thieme, Stuttgart, ed. 2, 2006).
17. K. Zilles, B. Tillmann, Eds., *Anatomie, Mit 121 Tabellen* (Springer-Medizin-Verl., Heidelberg, 2010).

18. J. Guibourdenche, T. Fournier, A. Malassiné, D. Evain-Brion, Hormones and human trophoblast differentiation // Development and hormonal functions of the human placenta, *Folia Histochem. Cytobiol.* **47**, 40 (2009), doi:10.2478/v10042-009-0110-3.
19. J. S. Hunt, M. G. Petroff, R. H. McIntire, C. Ober, HLA-G and immune tolerance in pregnancy, *FASEB J.* **19**, 681–693 (2005), doi:10.1096/fj.04-2078rev.
20. S. K. Kshirsagar *et al.*, Immunomodulatory molecules are released from the first trimester and term placenta via exosomes, *Placenta*. **33**, 982–990 (2012), doi:10.1016/j.placenta.2012.10.005.
21. J. S. Hunt, J. L. Pace, P. J. Morales, C. Ober, Immunogenicity of the soluble isoforms of HLA-G, *Mol. Hum. Reprod.* **9**, 729–735 (2003).
22. S. Srisuparp, Z. Strakova, A. T. Fazleabas, The role of chorionic gonadotropin (CG) in blastocyst implantation, *Arch. Med. Res.* **32**, 627–634 (2001).
23. M. Stauber, T. Weyerstahl, *Gynäkologie und Geburtshilfe* (Georg Thieme, Stuttgart, ed. 3, 2007).
24. Q. J. Shi, Z. M. Lei, C. V. Rao, J. Lin, Novel role of human chorionic gonadotropin in differentiation of human cytotrophoblasts, *Endocrinology*. **132**, 1387–1395 (1993), doi:10.1210/endo.132.3.7679981.
25. P. Licht, H. Cao, Z. M. Lei, C. V. Rao, W. E. Merz, Novel self-regulation of human chorionic gonadotropin biosynthesis in term pregnancy human placenta, *Endocrinology*. **133**, 3014–3025 (1993), doi:10.1210/endo.133.6.8243330.
26. R. W. Grimes, G. J. Pepe, E. D. Albrecht, Regulation of human placental trophoblast low-density lipoprotein uptake in vitro by estrogen, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **81**, 2675–2679 (1996), doi:10.1210/jcem.81.7.8675596.
27. E. Merck, Ed., *Apiol und Apiolin, WISSENSCHAFTLICHE ABHANDLUNGEN AUS DEN GEBIETEN DER PHARMAKOTHERAPIE, PHARMAZIE UND VERWANDTER DISZIPLINEN* (Merck, Darmstadt, 1914).
28. R. Lieberei, C. Reisdorff, *Nutzpflanzen* (Thieme, Stuttgart, ed. 8, 2012).
29. Simon, J. E., Chadwick, A. F., & Craker, L. E., Ed., *Herbs: an indexed bibliography, 1971–1980., The scientific literature on selected herbs, and aromatic and medicinal plants of the temperate zone.* (Archon Books, Hamden, 1984).
30. H. Schilcher, *Leitfaden Phytotherapie* (Elsevier, Urban & Fischer, München, ed. 4, 2010).
31. C. A. Newall, L. A. Anderson, J. D. Phillipson, *Herbal medicines, A guide for health-care professionals* (Pharmaceutical Press, London, 1996).
32. M. H. Farzaei, Z. Abbasabadi, Ardekani, Mohammad Reza Shams, R. Rahimi, F. Farzaei, Parsley: a review of ethnopharmacology, phytochemistry and biological activities, *Journal of Traditional Chinese Medicine*. **33**, 815–826 (2013), doi:10.1016/S0254-6272(14)60018-2.
33. F. YILDIZ and E. Gultekin. Food Engineering, Middle East Technical University, Eskisehir Yolu, Ankara, 06531, Turkey, Genistein content of the Mediterranean foods: Parsley (*Petroselinum crispum*), sage (*Salviae folium*). **2004**.
34. U. Justesen, P. Knuthsen, Composition of flavonoids in fresh herbs and calculation of flavonoid intake by use of herbs in traditional Danish dishes, *Food Chemistry*. **73**, 245–250 (2001), doi:10.1016/S0308-8146(01)00114-5.
35. Obdyke D.L.J., Parsley seed oil, *Food and Cosmetics Toxicology*. **13**, 897–898 (1975), doi:10.1016/0015-6264(75)90271-0.

36. P. WONG, D. KITTS, Studies on the dual antioxidant and antibacterial properties of parsley (*Petroselinum crispum*) and cilantro (*Coriandrum sativum*) extracts, *Food Chemistry*. **97**, 505–515 (2006), doi:10.1016/j.foodchem.2005.05.031.
37. J. Nawrocki, Effectiveness of some substances in the control of carrot and parsley roots against fungal diseases, *Commun. Agric. Appl. Biol. Sci.* **72**, 819–824 (2007).
38. L. Yıldız, K. S. Başkan, E. Tütem, R. Apak, Combined HPLC-CUPRAC (cupric ion reducing antioxidant capacity) assay of parsley, celery leaves, and nettle, *Talanta*. **77**, 304–313 (2008), doi:10.1016/j.talanta.2008.06.028.
39. I. Hinneburg, H. J. Damien Dorman, R. Hiltunen, Antioxidant activities of extracts from selected culinary herbs and spices, *Food Chemistry*. **97**, 122–129 (2006), doi:10.1016/j.foodchem.2005.03.028.
40. O. Ozsoy-Sacan *et al.*, Effects of parsley (*Petroselinum crispum*) extract versus glibornuride on the liver of streptozotocin-induced diabetic rats, *Journal of Ethnopharmacology*. **104**, 175–181 (2006), doi:10.1016/j.jep.2005.08.069.
41. C. Ciganda, A. Laborde, Herbal Infusions Used for Induced Abortion, *Clinical Toxicology*. **41**, 235–239 (2003), doi:10.1081/CLT-120021104.
42. emel Tasci Duran, Senay Unsal Atan, Oya Kavlak, Traditional practices for Turkish women's Gynecologic complaints, *Indian Journal of Traditional Knowledge*. **2012**, 414–419 (2012).
43. S. I. Kreydiyyeh, J. Usta, Diuretic effect and mechanism of action of parsley, *Journal of Ethnopharmacology*. **79**, 353–357 (2002), doi:10.1016/S0378-8741(01)00408-1.
44. S. KREYDIYYEH, The mechanism underlying the laxative properties of Parsley extract, *Phytomedicine*. **8**, 382–388 (2001), doi:10.1078/0944-7113-00058.
45. T. Al-Howiriny, M. Al-Sohaibani, K. El-Tahir, S. Rafatullah, Prevention of experimentally-induced gastric ulcers in rats by an ethanolic extract of "Parsley" *Petroselinum crispum*, *Am. J. Chin. Med.* **31**, 699–711 (2003), doi:10.1142/S0192415X03001405.
46. A. Y. Leung, *Encyclopedia of common natural ingredients used in food, drugs, and cosmetics* (Wiley, New York, ©1980).
47. A. Sharaf, I. A. Abdou, M. F. Saddik, Pharmaco-chemical studies on petroselinum Hortense (parsley), grown in Egypt, *Plant Food Hum Nutr.* **17**, 337–346 (1969), doi:10.1007/BF01100198.
48. Prof. Dr. L. van Itallie, Dr. A. Harmsma, Dr. L. W. van Esveld, *Die Untersuchung von Abortiva, besonders, „Apiol”* (1931).
49. Anast. A. Christomanos., *Zur Pharmakologie des Apiols und einiger seiner Verwandten*, Aus dem Pharmakologischen Institut der Universit/it Berlin (1927).
50. Dr. Hans Krakauer., *Über tödliche Apiol-Vergiftung bei kriminellm Abort.*
51. Dr. Dr. E. Schifferli, Abtreibungen und Abtreibungsversuche mit pflanzlichen Materialien, *Zeitschrift für die gesamte gerichtliche Medizin*, doi:10.1007/BF01750080.
52. E. Schifferli, Einige Fälle von Abtreibung durch „Apiol“-Präparate, *Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med.* **30**, 55–58 (1938), doi:10.1007/BF01757001.
53. Jagdhold H., *Apiols als Abortivum, Bericht von H. Jagdhold, Dresden-Weißer Hirsch.*, Sammlung von Vergiftungsfällen (Bad Weißer, 1933). **Vol. 4**.
54. H. Jagdhold, Trikresylphosphat-Vergiftungen durch Gebrauch verfälschter Apiolpräparate, *Vergiftungsfälle*. **5**, 1–2 (1934), doi:10.1007/BF02454710.
55. K. Hermann, A. Roux, F. S. Fiddes, DEATH FROM APIOL USED AS ABORTIFACIENT, *The Lancet*. **267**, 937–939 (1956), doi:10.1016/S0140-6736(56)91522-7.

56. S. D. Segalla, The 1959 Moroccan oil poisoning and US Cold War disaster diplomacy, *The Journal of North African Studies*. **17**, 315–336 (2012), doi:10.1080/13629387.2011.610118.
57. N. L. Etkin, *Plants in indigenous medicine & diet, Biobehavioral approaches* (Redgrave Pub. Co., Bedford Hills, N.Y., 1986).
58. M. S. Baliga *et al.*, Update on the chemopreventive effects of ginger and its phytochemicals, *Crit Rev Food Sci Nutr*. **51**, 499–523 (2011), doi:10.1080/10408391003698669.
59. Fred Siewek, *Ingwer*, Römp Online (2003) (available at <https://roempp.thieme.de/roempp4.0/do/data/RD-09-00670>).
60. Muhammed Majeed, Ph.D., Lakshmi Prakash, Ph.D, *GINGER (ZINGIBER OFFICINALE), PRODUCT WRITE-UP* (2007).
61. Steven D. Ehrlich, *Ginger, A private practice specializing in complementary and alternative medicine* (2010) (available at <http://umm.edu/health/medical/altmed/herb/ginger>).
62. E. Langner, S. Greifengberg, J. Gruenwald, Ginger: history and use, *Adv Ther*. **15**, 25–44 (1998).
63. P. Hajicek, *Natural liberty*, 232–237 (2008).
64. T. Johns, L. Sibeko, Pregnancy outcomes in women using herbal therapies, *Birth Defect Res B*. **68**, 501–504 (2003), doi:10.1002/bdrb.10052.
65. M. Ding, M. Leach, H. Bradley, The effectiveness and safety of ginger for pregnancy-induced nausea and vomiting: a systematic review, *Women Birth*. **26**, 30 (2013), doi:10.1016/j.wombi.2012.08.001.
66. A. J. Langhammer, O. G. Nilsen, In vitro Inhibition of Human CYP1A2, CYP2D6, and CYP3A4 by Six Herbs Commonly Used in Pregnancy, *Phytother Res* (2013), doi:10.1002/ptr.5037.
67. V. Briesse, M. Bolz, T. Reimer, *Krankheiten in der Schwangerschaft, Handbuch der diagnosen von A-Z* (De Gruyter, Berlin, 2010).
68. V. Briesse, *Arzneimittel und Nahrungsergänzungsmittel in Schwangerschaft und Stillzeit, Handbuch von A bis Z* (Walter de Gruyter, Berlin, New York, 2011).
69. G. Dante, G. Pedrielli, E. Annessi, F. Facchinetti, Herb remedies during pregnancy: a systematic review of controlled clinical trials, *J Matern Fetal Neonatal Med*. **26**, 306–312 (2013), doi:10.3109/14767058.2012.722732.
70. R. Mohammadbeigi, S. Shahgeibi, N. Soufizadeh, M. Rezaie, F. Farhadifar, Comparing the effects of ginger and metoclopramide on the treatment of pregnancy nausea, *Pak J Biol Sci*. **14**, 817–820 (2011).
71. H. J. Kliman, J. E. Nestler, E. Sermasi, J. M. Sanger, Strauss, J F 3rd, Purification, characterization, and in vitro differentiation of cytotrophoblasts from human term placentae, *Endocrinology*. **118**, 1567–1582 (1986).
72. U. Jeschke, V. Briesse, D. Richter, S. Kunkel, Stimulierungsversuche von Trophoblastzellen in vitro mit Hilfe von PP14, *Z Geburtshilfe Neonatol*. **200**, 199–201 (1996).
73. D. U. Richter, *Untersuchungen zu Expressionen von Thomsen-Friedenreich-, Mucin-1-Antigenen und Apoptosemarkern in der Normal- und Abortplazenta und in Trophoblastzellen in vitro* (2004).
74. H. Lohninger, *Teach/Me Instrumentelle Analytik, Massenspektrometrie - Einführung* (14.12.2010) (available at http://www.vias.org/tmanalytik_germ/hl_ms_intro.html).
75. J. McKnight Halket, H.-R. Schulten, Fast profiling of food by analytical pyrolysis, *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*. **186**, 201–212 (1988), doi:10.1007/BF01043313.

76. M. Franke, G. Jandl, P. Leinweber, Analytical pyrolysis of re-circulated leachates: Towards an improved municipal waste treatment, *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*. **79**, 16–23 (2007), doi:10.1016/j.jaap.2006.11.011.
77. Guido Deußing, Ilka Ottleben, *Flexible Materialanalytik mittels Pyrolyse und Standard-GC/MS* (29.06.11) (available at <http://www.laborpraxis.vogel.de/analytik/chromatographie/gaschromatographie/articles/321214/>).
78. A. Heidenreich, Staats- und Universitätsbibliothek Hamburg (2006).
79. J. H. Gross, *Mass spectrometry, A textbook* (Springer, Heidelberg, New York, ed. 2, 2011).
80. Wikipedia, Die freie Enzyklopädie., *Massenspektrometrie, Auswertung der Massenspektren* (2014) (available at <http://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Massenspektrometrie&oldid=133651392>).
81. A. Bruckner, Kinetische Glucosebestimmung nach der Glucosedehydrogenase-Methode mit dem Analysenautomaten ACP 5040 (Eppendorf), *J. Clin. Chem. Clin. Biochem. / Vol. 18,1980 / No. 5*, 275–278 (1980).
82. T. Mosmann, *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays* (1983).
83. M. Watzele, T. Nikolaus, H. J. RODE, *Chromogene Tests in Gegenwart von Zellen* (Google Patents, 2007) (available at <http://www.google.com/patents/EP1795605A1?cl=de>).
84. Promega Corporation, Ed., *CytoTox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay, Technical Bulletin* (2012).
85. ANIARA Int., Ed., *In Cytotox - LDH - Kit, Instructions for use*.
86. S.-A. Corp, Triton™ X-100 (T8532) - Product Information Sheet. **1999**.
87. Roche Diagnostics, Ed., *Cytotoxicity Detection Kit (LDH)*.
88. B. Halliwell, Oxidative stress in cell culture: an under-appreciated problem?, *FEBS Letters*. **540**, 3–6 (2003), doi:10.1016/S0014-5793(03)00235-7.
89. R. Kohen, A. Nyska, Oxidation of Biological Systems: Oxidative Stress Phenomena, Antioxidants, Redox Reactions, and Methods for Their Quantification, *Toxicologic Pathology*. **30**, 620–650 (2002), doi:10.1080/01926230290166724.
90. L. Myatt, X. Cui, Oxidative stress in the placenta, *Histochem Cell Biol*. **122**, 369–382 (2004), doi:10.1007/s00418-004-0677-x.
91. B. Chance, H. Sies, A. Boveris, Hydroperoxide metabolism in mammalian organs, *Physiol Rev*. **59**, 527–605 (1979).
92. J. Hempstock *et al.*, Intralobular differences in antioxidant enzyme expression and activity reflect the pattern of maternal arterial bloodflow within the human placenta, *Placenta*. **24**, 517–523 (2003).
93. M. F. McAleer, R. S. Tuan, Metallothionein protects against severe oxidative stress-induced apoptosis of human trophoblastic cells, *In Vitro Mol Toxicol*. **14**, 219–231 (2001), doi:10.1089/109793301753407975.
94. BioVision Incorporated, *BioVision Hydrogen Peroxide Colorimetric/Fluorometric Assay Kit* (2013) (available at <http://www.biovision.com/manuals/K265.pdf>).
95. Beckman Coulter Ireland Inc., *Access Total β-hCG* (2003) (available at http://labmed.ucsf.edu/labmanual/db/resource/Access_BetaHCG.pdf).
96. Abbott Laboratories Ireland Diagnostics Division, *ARCHITECT System Estradiol B7K720* (November 2009) (available at http://www.illexmedical.com/files/PDF/Estradiol_ARC.pdf).

97. N. Pavlov *et al.*, Angiogenin expression during early human placental development; association with blood vessel formation, *Biomed Res Int.* **2014** (2014), doi:10.1155/2014/781632.
98. J. Maldonado-Estrada, E. Menu, P. Roques, F. Barré-Sinoussi, G. Chaouat, Evaluation of Cytokeratin 7 as an accurate intracellular marker with which to assess the purity of human placental villous trophoblast cells by flow cytometry, *J. Immunol. Methods.* **286**, 21–34 (2004), doi:10.1016/j.jim.2003.03.001.
99. M. D. Al-Bader, N. Kilarkaje, A. El-Farra, A. A. Al-Abdallah, Expression and Subcellular Localization of Metastasis-Associated Protein 1, Its Short Form, and Estrogen Receptors in Rat Placenta, *Reprod Sci* (2014), doi:10.1177/1933719114549851.
100. Poynter, Samuel D H, R. A. Shellie, High-speed, low-pressure gas chromatography-mass spectrometry for essential oil analysis, *Journal of chromatography. A.* **1200**, 28–33 (2008), doi:10.1016/j.chroma.2008.03.069.
101. A. Plazonić *et al.*, Identification and quantification of flavonoids and phenolic acids in burr parsley (*Caucalis platycarpos* L.), using high-performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ionization mass spectrometry, *Molecules (Basel, Switzerland).* **14**, 2466–2490 (2009), doi:10.3390/molecules14072466.
102. G. Löffler, J. Schölmerich, *Basiswissen Biochemie, Mit Pathobiochemie ; mit 139 Tabellen ; [jetzt mit Fällen]* (Springer, Heidelberg, ed. 7, 2008).
103. Fraunhofer-Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik IGB, *Biologische Beurteilung von Medizinprodukten – Prüfungen auf Zytotoxizität nach DIN ISO 10993-5* (available at http://www.igb.fraunhofer.de/content/dam/igb/de/documents/broschueren/Biologische_Beurteilung_von_Medizinprodukten__Pruefungen_auf_in_vitro_zytotoxizitaet_nach_din_iso_10993_5.pdf).
104. K.-G. von Boroviczény, R. Merten, U. P. Merten, *Qualitätssicherung, Im Medizinischen Laboratorium* (Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 1987).
105. S.S. Choudhari, B.M. Kareppa, IDENTIFICATION OF BIOACTIVE COMPOUNDS OF ZINGIBER OFFICINALE ROSCOE RHIZOMES THROUGH GAS CHROMATOGRAPHY AND MASS SPECTROMETRY, *International Journal of Pharmaceutical Research and Development (IJPRD).* **2013**, 16–20 (2013).
106. M. Asadollahi-Baboli, A. Aghakhani, Application of polyaniline–nylon-6 nanocomposite, GC-MS and chemometrics for rapid and comprehensive analysis of Zingiber officinale fragrance components, *Anal. Methods.* **6**, 4279 (2014), doi:10.1039/C4AY00071D.
107. B. E. Bax, D. L. Bloxam, Energy metabolism and glycolysis in human placental trophoblast cells during differentiation, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics.* **1319**, 283–292 (1997), doi:10.1016/S0005-2728(96)00169-7.
108. L. Nadeem *et al.*, Nodal signals through activin receptor-like kinase 7 to inhibit trophoblast migration and invasion: implication in the pathogenesis of preeclampsia, *The American journal of pathology.* **178**, 1177–1189 (2011), doi:10.1016/j.ajpath.2010.11.066.
109. J. Stubert, K. Waldmann, M. Dieterich, D.-U. Richter, V. Briesse, Progranulin shows cytoprotective effects on trophoblast cells in vitro but does not antagonize TNF- α -induced apoptosis, *Archives of gynecology and obstetrics.* **290**, 867–873 (2014), doi:10.1007/s00404-014-3296-3.
110. A. A. Alafiatayo, A. Syahida, M. Mahmood, Total anti-oxidant capacity, flavonoid, phenolic Acid and polyphenol content in ten selected species of zingiberaceae rhizomes, *African journal of*

- traditional, complementary, and alternative medicines : AJTCAM / African Networks on Ethnomedicines*. **11**, 7–13 (2014).
111. G. H. Park *et al.*, Anti-cancer activity of Ginger (*Zingiber officinale*) leaf through the expression of activating transcription factor 3 in human colorectal cancer cells, *BMC complementary and alternative medicine*. **14**, 408 (2014), doi:10.1186/1472-6882-14-408.
 112. T. A. Lantto, M. Colucci, V. Závadová, R. Hiltunen, A. Raasmaja, Cytotoxicity of curcumin, resveratrol and plant extracts from basil, juniper, laurel and parsley in SH-SY5Y and CV1-P cells, *Food Chemistry*. **117**, 405–411 (2009), doi:10.1016/j.foodchem.2009.04.018.
 113. Dorman, H. J. Damien, T. A. Lantto, A. Raasmaja, R. Hiltunen, Antioxidant, pro-oxidant and cytotoxic properties of parsley, *Food Funct.* **2**, 328 (2011), doi:10.1039/c1fo10027k.
 114. L.-C. Kao, S. Caltabiano, S. Wu, J. F. Strauss, H. J. Kliman, The human villous cytotrophoblast: Interactions with extracellular matrix proteins, endocrine function, and cytoplasmic differentiation in the absence of syncytium formation, *Developmental Biology*. **130**, 693–702 (1988), doi:10.1016/0012-1606(88)90361-2.
 115. D. U. Richter *et al.*, Effects of phytoestrogens genistein and daidzein on progesterone and estrogen (estradiol) production of human term trophoblast cells in vitro, *Gynecol Endocrinol.* **25**, 32–38 (2009), doi:10.1080/09513590802485020.
 116. C. Pelissero *et al.*, Effects of flavonoids on aromatase activity, an in vitro study, *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. **57**, 215–223 (1996), doi:10.1016/0960-0760(95)00261-8.
 117. R. Monteiro, I. Azevedo, C. Calhau, Modulation of Aromatase Activity by Diet Polyphenolic Compounds, *J. Agric. Food Chem.* **54**, 3535–3540 (2006), doi:10.1021/jf053237t.
 118. N. Saarinen *et al.*, No evidence for the in vivo activity of aromatase-inhibiting flavonoids, *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. **78**, 231–239 (2001), doi:10.1016/S0960-0760(01)00098-X.
 119. S. Fejes *et al.*, Free radical scavenging and membrane protective effects of methanol extracts from *Anthriscus cerefolium* L. (Hoffm.) and *Petroselinum crispum*(Mill.) nym. ex A.W. Hill, *Phytother Res.* **14**, 362–365 (2000).
 120. Rolf Ulrich Schäfer, Hypoxie-induzierte Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) in isoliert perfundierten und ventilierten Mauslungen. **2007**.

9 Anhang

9.1 Verwendete Chemikalien, Puffer, Lösungen und Test-Kits

Extraktherstellung und Verdünnungsreihen

- DMEM High Glucose 4,5 g/l (+L-Glutamin, ohne Phenolrot), PAA, Pasching, Österreich
- Zentrifuge Universal 320R, Hettich, Tuttlingen, Deutschland
- Mikrozentrifuge Biofuge Pico, Heraeus, Hanau, Deutschland
- Entsafter Philips HR1861/00 Aluminium Serie

Trophoblastenisolierung

- Metronidazol 5mg/ml Infusionslösung, B. Braun, Melsungen, Deutschland
- Heparin-Natrium, Ratiopharm, Ulm, Deutschland
- Benzylpenicillin-Natrium, InfectoPharm, Heppenheim, Deutschland
- Desoxyribonuklease I, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
- Trypsin, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
- Hank's Salt Solution (HBSS-Puffer, 0,35 g/l NaHCO₃, Ca²⁺, Mg²⁺, ohne Phenolrot), Biochrom AG, Berlin, Deutschland
- DMEM High Glucose 4,5 g/l (+L-Glutamin, ohne Phenolrot), PAA, Pasching, Österreich
- NBGS, Biochrom AG, Berlin, Deutschland
- NaCl, 99,99 % (auf 0,9 %, 2,7 % mit Aqua dest.), Roth, Karlsruhe, Deutschland
- Easycoll Separating Solution (Percoll), Biochrom AG, Berlin, Deutschland
- Trypanblau (0,4 %), Gibco, Grand Island, New York
- MHC class I mouse monoclonal IgG (W6/32) sc-32235, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas
- Goat-anti-Mouse IgG Micro Beads, Miltenyi Biotec,

Bergisch-Gladbach, Deutschland

- Mini MACS Elutionsspritze + Separationssäule, Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Deutschland
- Einmal-Injektionskanüle Sterican, B. Braun, Melsungen, Deutschland
- sterile Spritze Discardit II 10 ml, Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
- Gaze 10 µm, SteriClin, Feuchtwangen, Deutschland
- Zentrifugenröhrchen 15 ml/ 50 ml, TPP, Trasadingen, Schweiz
- Zentrifuge Megafuge 1.0, Heraeus, Hanau, Deutschland
- Sterilbank Hera safe, Heraeus, Hanau, Deutschland
- Pipetten, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
- Sterile Pipetten, Biochrom AG. Berlin, Deutschland

Anlage der Zellkulturen

- DMEM High Glucose 4,5 g/l (+L-Glutamin, ohne Phenolrot), PAA
- FKS, Biochrom AG, Berlin, Deutschland
- Amphotericin B 250µg/ml, PAA, Pasching, Österreich
- Penicillin/Streptomycin (100x), PAA, Pasching, Österreich
- 12-/96-Well-Platten, Zellkultur Testplatten, TPP, Trasadingen, Schweiz

pH-Messung

- pH-Meter 761 Calimatic, Knick; Berlin, Deutschland mit pH-Elektrode BlueLine 23, Schott, Mainz, Deutschland
- pH-Meter Orion 3-Star Plus pH Benchtop Meter, Thermo Scientific
- Pufferlösungen für Kalibrierung (pH 7,00; 4,01; 8,01), Roth, Karlsruhe, Deutschland

Immunhistochemie

- Monoclonal Mouse Anti-Human Cytokeratin-7, Dako, Carpinteria, Kalifornien
- ImmPress Reagent Kit (Universal Anti-Mouse/ Rabbit Ig, Peroxidase), Vector Laboratories, Burlingame, Kalifornien
- Wasserstoffperoxid 35%, Merck, Darmstadt, Deutschland
- Formafix 4 % gepuffert, Grimm med. Recycling GmbH, Torgelow, Deutschland
- LinRed IHC HRP-Substrat, Linaris Biologische Produkte GmbH, Dossenheim, Deutschland
- PBS (Dulbeccos PBS powdered buffer), PAA, Pasching, Österreich

9.2 Zusammenarbeit mit Instituten und (Fremd-)Einrichtungen

Elektrolyt-, hCG-Konzentrations- und Glucosemessung

Medizinisches Zentrallabor Klinikum Südstadt, Südring 81, 18059 Rostock

Estradiolkonzentrationsmessung

PRIMACYT Cell Culture Technology GmbH, Hagenower Straße 73, 19061 Schwerin

Herkunft der Plazenten

Termplazenten: Kreissaal /
Abruptionen: Ambulanter Op

Klinikum Südstadt,
Südring 81,
18059 Rostock

Pyrolyse-Feldionisations-Massenspektrometrie (Py-FIMS)

Institut für Bodenkunde - Fakultät für Agrar- und Umweltwissenschaften der Universität Rostock, Justus-von-Liebig-Weg 6, 18059 Rostock

Pflanzenbilder

Botanischer Garten Universität Rostock, Schwaansche Straße 2, 18051 Rostock

9.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Schematische Darstellung eines Schnittbildes durch eine humane, reife Plazenta (14)	8
Abbildung 2:	Schematisierter Aufbau der frühen (links) und reifen (rechts) Plazentaschranke (12)	9
Abbildung 3:	β -hCG-Konzentration im Wochenverlauf. Gemessen im Urin (a) und im Serum und Urin (b) (23).....	12
Abbildung 4:	Strukturformel Estradiol (1)	13
Abbildung 5:	Petroselinum crispum fotografiert im Botanischen Garten Rostock	13
Abbildung 6:	Strukturformel Apiol (1)	15
Abbildung 7:	Blüte eines Zingiber officinale im botanischen Garten Rostock.....	17
Abbildung 8:	Verwendeter Objektträger mit Bürker-Zählkammer	25
Abbildung 9:	Linienchema der Bürker-Zählkammer	25
Abbildung 10:	Py-FIMS-Spektrum sowie Thermogramm einer Ingwer-Probe	28
Abbildung 11:	Farbreaktion des LDH-Kits (83).....	32
Abbildung 12:	Mineralien- und Glucosekonzentration der unverdünnten Extrakte.....	41
Abbildung 13:	Eisenkonzentration der Extrakte	42
Abbildung 14:	Folsäurekonzentration der Extrakte.....	42
Abbildung 15:	Massenspektrum einer Probe aus Petersilienwurzel mit zugehörigem Thermogramm	43
Abbildung 16:	Massenspektrum einer Probe aus Ingwerwurzel mit zugehörigem Thermogramm	44
Abbildung 17:	Percollgradient nach Zentrifugation.....	45
Abbildung 18:	Oh frisch isolierte Trophoblasten.....	47
Abbildung 19:	24h Zellaggregation	47
Abbildung 20:	48h Synzytiumbildung	47
Abbildung 21:	72h Synzytiotrophoblast.....	47
Abbildung 22:	96h Größenzunahme	47
Abbildung 23:	144h Ausgereifter Synzytiotrophoblast.....	47
Abbildung 24:	CK7-Nachweis Synzytiotrophoblast mit „Schweif“	49
Abbildung 25:	CK7-Nachweis granulierter Synzytiotrophoblast	49
Abbildung 26:	Nachweis des beta-1-Estrogenrezeptors	49
Abbildung 27:	Negativkontrolle.....	49
Abbildung 28:	Termplazenten - Absolute Glucosekonzentration im Mediumüberstand nach 24h (linker Balken) und 144h (rechter Balken - davon 72h unter Extraktbeimpfung). Gemittelte Absolutwerte von 5 Termplazenten mit Standardabweichung.....	50
Abbildung 29:	Termplazenten - Änderung der Glucosekonzentration im Vergleich zur Nullprobe (Medium) nach 24h (linker Balken) und 144h (rechter Balken - davon 72h unter Extraktbeimpfung). Relative Änderung zur Glucosekonzentration im Medium (Glucosekonz. im Medium \triangleq 100%), gemittelt aus 5 Termplazenten mit Standardabweichung.	51
Abbildung 30:	Abruptioplazenten - Absolute Glucosekonzentration im Mediumüberstand nach 24h (linker Balken) und 144h (rechter Balken - davon 72h unter Extraktbeimpfung). Gemittelte Absolutwerte von 5 Abruptioplazenten mit Standardabweichung.	52

Abbildung 31:	Abruptioplazenten - Änderung der Glucosekonzentration im Vergleich zur Nullprobe (Medium) nach 24h (linker Balken) und 144h (rechter Balken - davon 72h unter Extraktbeimpfung). Relative Änderung zur Glucosekonzentration im Medium (Glucosekonz. im Medium \triangleq 100%), gemittelt aus 5 Abruptioplazenten mit Standardabweichung.	53
Abbildung 32:	Gemittelte pH-Werte aus 5 Termplazenten nach 24h (linker Balken) und 144h (rechter Balken - davon 72h unter Extraktbeimpfung).....	55
Abbildung 33:	Gemittelte pH-Werte aus 5 Abruptioplazenten nach 24h (linker Balken) und 144h (rechter Balken - davon 72h unter Extraktbeimpfung).....	55
Abbildung 34:	Gemittelte H ₂ O ₂ -Konzentration im Mediumüberstand aus 5 Termplazenten nach 24h (linker Balken) und 144h (rechter Balken) mit Standardabweichung.....	58
Abbildung 35:	Gemittelte H ₂ O ₂ -Konzentration im Mediumüberstand aus 4 Abruptioplazenten nach 24h (linker Balken) und 144h (rechter Balken) mit Standardabweichung.....	58
Abbildung 36:	Gemittelte LDH-Zytotoxizität aus 5 Termplazentenproben im Vgl. zu Med + Zellen. Werte zwischen 0% bis 1% sind zur besseren Darstellbarkeit auf 1% gerundet.....	60
Abbildung 37:	Aus 3 Termplazenten gemittelte Zellviabilität mit Standardabweichung	62
Abbildung 38:	Gemittelte, relative β -hCG-Konzentration im Mediumüberstand aus 5 Abruptioproben.....	64
Abbildung 39:	Aus 5 Termproben gemittelte relative Estradiol-Konzentration im Überstand nach 144h.....	65
Abbildung 40:	Aus 5 Abruptioproben gemittelte relative Estradiol-Konzentration im Überstand nach 144h.....	66

9.4 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Folsäurebedarf nach DGE (6).....	6
Tabelle 2:	Herstellung der Extrakt-Verdünnungsreihen	20
Tabelle 3:	Reagenzzugabe pro Verdauungsschritt.....	22
Tabelle 4:	Schichtung des Percoll-Gradienten	24
Tabelle 5:	Übersicht der Extraktmessungen. Angaben in mmol/L	69

9.5 Formelverzeichnis

Formel 1:	Berechnung der Konzentration von Trophoblastzellen im Isolat bei Auszählung unter Bürker-Zählkammer	25
Formel 2:	Berechnung der Zellviabilität in % vergleichend zu Medium + Zellen	31
Formel 3:	LDH katalysierte Reaktion.....	32
Formel 4:	Diaphorase katalysierte Reaktion	32
Formel 5:	Berechnung der Zytotoxizität in % vergleichend zu Triton X-100.....	34
Formel 6:	Wasserstoffperoxid-Genese aus Sauerstoffradikalen	36
Formel 7:	Umrechnung der SI-Einheit nmol/l in µg/l.....	68

9.6 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Langtext / Bedeutung
%	<i>Prozent</i>
°C	<i>Grad Celsius</i>
λ	<i>Lamda, Formelzeichen für die Wellenlänge</i>
μg	<i>Mikrogramm = 1 Millionstel Gramm</i>
μm	<i>Mikrometer</i>
Aa.	<i>Arteriae (plural)</i>
ABTS	<i>2,2'-Azino-di-3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure</i>
CK-7	<i>Cytokeratin 7</i>
cm	<i>Zentimeter</i>
CMIA	<i>chemiluminescence immunoassay</i>
CO ₂	<i>Kohlenstoffdioxid</i>
DGE	<i>Deutschen Gesellschaft für Ernährung</i>
DHEAS	<i>Dehydroepiandrosteronsulfat</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	<i>Desoxyribonukleinsäure</i>
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
et al.	<i>lateinisch: "und andere", weitere Autoren</i>
FKS	<i>fetales Kälberserum</i>
g	<i>Gramm</i>
GC-MS	<i>gekoppelte Gas-Chromatographie-Massenspektrometrie</i>
GOD	<i>Glucose-Oxidase</i>
H ₂ O ₂	<i>Wasserstoffperoxid</i>
HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
hCCT	<i>humanes Chorioncorticotropin</i>
hCG	<i>humane Choriongonadotropin</i>
hCS	<i>humanes Chorionsomatiotropin</i>
hCT	<i>humanes Chorionthyrotropin</i>
HLA	<i>Human Leukocyte Antigen</i>

Abkürzung	Langtext / Bedeutung
ILT	<i>Ig-Like Transcript</i>
INT	<i>Redox-Farbstoff Triphenyltetrazoliumchlorid</i>
K	<i>Kalium</i>
LC ₅₀	Mittlere letale Konzentration
LD ₅₀	Mittlere letale Dosis
LDH	<i>L-Lactatdehydrogenase</i>
m/z	<i>Masse/Ladungs-Verhältnis</i>
MACS	<i>Magnetic Activated Cell Sorting</i>
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
mRNA	<i>Messenger Ribonucleic Acid</i>
MTT	<i>Zellviabilitätstest mit namengebendem wasserlöslichen Farbstoff: 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid</i>
Na	<i>Natrium</i>
NaCl	<i>Natriumchlorid (Kochsalz)</i>
NBCS	<i>neonatales Kälberserum</i>
O ₂	<i>molekularer Sauerstoff</i>
p. c.	<i>post conceptionem</i>
P450scc	<i>Cytochrom P450 cholesterol side chain cleavage</i>
PBS	<i>Phosphatgepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)</i>
PMS	<i>prämenstruelles Syndrom</i>
PNV	<i>pregnancy-induced nausea and vomiting, Schwangerschaftserbrechen, Emesis gravidarum</i>
PWS	<i>Petroselinumwurzelsaft</i>
Py-FIMS	<i>Pyrolyse-Feldionisations-Massenspektrometrie</i>
RCT	<i>Randomized controlled trial</i>
ROS	<i>reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygen species)</i>
RT	<i>Raumtemperatur</i>
SI-Einheiten	<i>Internationales Einheitensystem (französisch: Système international d'unités)</i>
SSW	<i>Schwangerschaftswoche</i>
THF	<i>Tetrahydrofolsäure</i>
Triton X-100	<i>Octoxinol 9</i>

Abkürzung	Langtext / Bedeutung
U/min	<i>Umdrehungen pro Minute</i>
V.	<i>Vena</i>
var.	<i>varietas (lateinisch: Varietät)</i>
Vgl.	<i>Vergleich</i>

9.7 Danksagung

Ich danke meinem Doktorvater Prof. Dr. Briese für die Bereitstellung des Themas, die konstruktiven Korrekturlesungen und den regen Austausch im Gespräch. Besonders möchte ich mich für die bis zum Ende hin entgegengebrachte Geduld bedanken.

Ich möchte mich herzlich bei meiner Betreuerin Frau PD. Dr. Richter bedanken, die nicht nur bei theoretischer Fragestellung Rat wusste, sondern auch bei der Laborarbeit praktisch anleitete.

Ebenso bedanke ich mich bei Frau Greschkowitz für die Unterstützung während der Laborarbeit.

Bedanken möchte ich mich bei Herrn Eckardt vom Institut für Bodenkunde der Universität Rostock für die Zusammenarbeit in der Massenspektroskopie.

Mein Dank gilt dem gesamten Team des Forschungslabors der Universität Rostock für die gemeinsam verbrachte Zeit und die durchweg freundliche Zusammenarbeit.

Schließlich war es die liebevolle Unterstützung meiner Familie, die mir diese Arbeit und vieles mehr ermöglichte.

9.8 Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Thema:

Petroselinum crispum und Zingiber officinale in einer Trophoblastfunktion in-vitro-Studie

Extrakte von Petersilien- und Ingwerwurzel in einer in-vitro-Studie

selbstständig verfasst und keine anderen Hilfsmittel als die angegebenen benutzt habe.

Die Stellen, die anderen Werken dem Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, habe ich in jedem einzelnen Fall durch Angabe der Quelle kenntlich gemacht.

Ich erkläre hiermit weiterhin, dass ich meine wissenschaftlichen Arbeiten nach den Prinzipien der guten wissenschaftlichen Praxis gemäß der gültigen „Regeln zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und zur Vermeidung wissenschaftlichen Fehlverhaltens“ an der Universität Rostock angefertigt habe.

Rostock,

Unterschrift: